

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie



Mgr. Monika Benešová

Odlišná reakce inbredních a hybridních genotypů kukuřice na sucho:
analýza listového proteomu a fotosyntetických procesů

Different response of maize inbred and hybrid genotypes to drought:
analysis of leaf proteome and photosynthetic processes

Dizertační práce

Školitel: RNDr. Dana Holá, Ph.D.
Školitel-konzultant: RNDr. Marie Kočová, CSc.
Školitel-konzultant: RNDr. Lukáš Fischer, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21.5.2014

Monika Benešová

Tato práce vznikla za finanční podpory projektů č. 521/07/0470 Grantové agentury České republiky, projektů 101808-B-BIO, SVV-2010-261214, SVV-2011-263206, SVV-2012-265202, SVV-2013-267205 a SVV-2014-260081 Grantové agentury Univerzity Karlovy a výzkumného záměru MSM0021620858 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Poděkování:

Mé poděkování patří především Dr. Daně Holé za její odborné vedení, neocenitelnou podporu a pomoc jak během experimentů, tak při utváření této práce, zároveň za její vždy laskavý a trpělivý přístup po celou dobu mého studia.

Dále děkuji Dr. Marii Kočové a Dr. Lukášovi Fisherovi za jejich cenné rady a odbornou konzultaci, Ing. Petrovi Jedelskému, Dr. Františkovi Hniličkovi a Dr. Heleně Hniličkové za ochotné poskytnutí výsledků nezbytných pro ucelenost této práce a v neposlední řadě Mgr. Janě Honnerové, Dr. Olze Rothové, Mgr. Lence Tůmové a celé skupině Laboratoře genetiky za nepostradatelnou pomoc při laboratorních pokusech.

Kolektivu pracovníků Genetické zahrady děkuji za péči o pokusný materiál. Své rodině a přítelovi děkuji za podporu a zázemí.

Abstrakt

Sucho je jedním z nejdůležitějších stresových faktorů působících na rostliny. Zvyšování odolnosti k suchu pomocí šlechtění je hlavním přístupem pro vylepšení produktivity rostlin a snížení spotřeby vodních zdrojů. Jsou hledány různé možnosti, jak snadno určit stupeň odolnosti/citlivosti různých genotypů k suchu. K tomu je potřeba důkladně porozumět procesům, kterými rostliny na suchu reagují a brání se proti němu. Cílem mojí práce bylo v rámci širšího projektu zaměřeného na studium možných příčin odolnosti k suchu u hospodářsky významných druhů rostlin detailně analyzovat jednak fotosyntetické procesy, jednak celkovou reakci listového proteomu na nedostatek vody (opět zaměřenou zejména na proteiny spojené s fotosyntézou). Dalším cílem bylo analyzovat využitelnost vybraných fotosyntetických parametrů pro zjišťování citlivosti k stresu suchem a pro případnou predikci reakce na suchu u potomků na základě známé reakce jejich rodičů. Modelovým objektem byly mladé rostliny inbredních linií kukuřice a jejich F1 kříženců, vystavené mírnému nebo silnějšímu stresu suchem, přičemž detailní analýza byla zaměřená na dvě kontrastní rodičovské linie vybrané ze širšího genotypového souboru na základě stanovení indexů citlivosti/odolnosti k suchu, a na oba jejich reciproké křížence. Studované genotypy se významně lišily ve strategiích, jak se chránit proti poškození vyvolanému tímto stresovým faktorem. Vnitrodruhové rozdíly v reakci na stres suchem byly zřejmě spojeny především s odlišnou rychlostí udržení funkční fotosyntézy v podmínkách sucha, závislou na tom, jak časné dojde u příslušného genotypu k uzavření průduchů, a s tím spojenou odlišnou biosyntézou/degradací proteinů podílejících se také především na fotosyntéze. U inbrední rodičovské linie citlivé k suchu vedly již mírné stresové podmínky k rychlému uzavření průduchů, což mělo za následek poměrně ranou inhibici fotosyntézy a v důsledku toho zřejmě i proteosyntézy. V pozdějších fázích stresové reakce se to projevovalo zejména na úrovni proteosyntézy v chloroplastech. Obdobný, ale mnohem výraznější efekt mělo sucho i na F1 křížence, který měl tuto citlivou linii jako mateřský genotyp. Delší udržení otevřených průduchů a normální fotosyntetické účinnosti u odolnější rodičovské linie, umožněné pravděpodobně menší velikostí tohoto genotypu a nižším poměrem mezi nadzemní částí a kořeny, bylo spojeno se zachováním aktivní proteosyntézy. Tento genotyp v podmínkách sucha také upřednostňoval primární fotosyntetické procesy spojené s fotosystémem I, což mohlo být spojeno s dalšími výhodami. Reciproký F1 kříženec sice rovněž vykazoval některé znaky, které by mohly souviset s odolností k suchu, udržet průduchy otevřené dostatečně dlouho však nedokázal a jeho energetické zdroje tedy nakonec zřejmě nebyly dostatečné pro normální růst a současně účinnou obrannou reakci vůči stresovým podmínkám. Hlavní příčinou odlišné reakce kříženců na stres ve srovnání s rodiči byla tedy patrně větší ztráta účinnosti fotosyntézy vzhledem k jejich původním dispozicím k většímu vzrůstu a akumulaci biomasy. Nepřítomnost korelace mezi reakcí rodičů a reakcí jejich potomků na suchu, související s výraznými neaditivními efekty (prokázanými i kvantitativní genetickou analýzou), byla hlavním důvodem toho, proč nelze použití fotosyntetických parametrů v programech zaměřených na šlechtění kukuřice na odolnost k suchu příliš doporučit.

Klíčová slova

Fotosyntéza; genetická analýza; odolnost k stresu; proteomika; sekundární selekční znaky; sucho; vnitrodruhová variabilita

Abstract

Drought is one of the most important stress factors affecting plants. Increasing drought resistance *via* plant breeding is currently the main approach for improvement of plant productivity and reduction of water usage. Plant breeders and scientists search for reliable and easy methods of the determination of drought sensitivity in different genotypes. A precise knowledge about processes underlying plant stress response and defence against limited water availability is necessary for this. The aim of this study was a detailed analysis of photosynthetic processes and changes in leaf proteome (again aimed especially at proteins involved in photosynthesis) during drought stress. This analysis was a part of a complex project focused on the possible causes of genetic variability and drought resistance in agronomically important crops. Another goal was to analyse whether the measurement of selected photosynthetic parameters can be used for the determination of drought sensitivity *per se* and/or for the prediction of the response of hybrids based on known behaviour of their parents. Young plants of maize inbred lines and their hybrids were used as a model for this analysis, which was made under conditions of moderate and more severe drought. Two inbred lines which were (together with their F1 hybrids) used for a detailed analysis were selected from a larger genotypic set based on the comparison of their drought tolerance/sensitivity indices. They differed in their strategies how to protect themselves against the damage resulting from drought. Intraspecific variability in response to drought was probably connected to the different ability to maintain efficient photosynthesis during dehydration, which was determined by an early stomatal closure and related to different biosynthesis/degradation of proteins involved mainly in photosynthesis. The drought-sensitive inbred line showed an early stomatal closure already during short-term drought inducing an early inhibition of photosynthesis and subsequently also limitation of proteosynthesis. After long-term drought, proteosynthesis in chloroplasts was particularly sensitive to stress. Similar, but much more pronounced effect was found in the F1 hybrid which had this sensitive inbred line as a maternal parent. Contrary to this, the less sensitive inbred line was able to keep stomata open and maintain normal photosynthetic efficiency despite water limitation, probably due to its smaller size and lower shoot/root ratio. Maintenance of active proteosynthesis under conditions of moderate stress could result from this behaviour. Another advantage of this genotype was a preference for a photosystem I-associated electron transport. The reciprocal F1 hybrid also showed some features related to drought resistance, but was not able to keep stomata open for a sufficiently long period of dehydration, resulting probably in insufficient energy sources for normal growth while coping with stress. The main cause of different response of hybrids (compared to their inbred parents) to drought was probably their higher loss of photosynthetic efficiency in relation to their original disposition for a larger size and biomass accumulation. The absence of significant correlation between inbred and hybrid response to drought, associated with the presence of significant non-additive genetic effects (as proven also by quantitative genetic analysis), was the main reason for the conclusion that the applicability of the examined photosynthetic parameters in maize breeding for better drought resistance is very limited.

Keywords

Drought; genetic analysis; intraspecific variability; photosynthesis; proteomics; secondary selection traits; stress tolerance

Obsah

| | |
|---|-----|
| Obsah | 5 |
| Seznam použitých zkratek..... | 6 |
| 1. Úvod a cíle práce | 11 |
| 2. Literární přehled..... | 13 |
| 2.1. Šlechtění rostlin na odolnost k suchu | 13 |
| 2.1.1. Příčiny odolnosti rostlin k suchu | 14 |
| 2.1.1.1. Strategie úniku před suchem | 15 |
| 2.1.1.2. Strategie zabránění stresu suchem..... | 15 |
| 2.1.1.3. Strategie přizpůsobení se na stres suchem | 20 |
| 2.1.2. Fotosyntetické parametry ve šlechtění na odolnost k suchu..... | 26 |
| 2.1.2.1. Charakteristiky založené na měření výměny plynů | 27 |
| 2.1.2.2. Obsah fotosyntetických pigmentů..... | 29 |
| 2.1.2.3. Charakteristiky založené na měření fluorescence chlorofylu..... | 31 |
| 2.1.3. Molekulární šlechtění na odolnost k suchu | 34 |
| 2.2. Proteomické analýzy u rostlin vystavených suchu | 38 |
| 2.2.1. Analýzy listového proteomu rostlin v souvislosti se stresem suchem | 42 |
| 2.2.2. Změny fotosyntetických proteinů v důsledku sucha | 52 |
| 2.2.2.1. Proteiny primárních fotosyntetických procesů..... | 53 |
| 2.2.2.2. Proteiny fotosyntetické fixace CO ₂ | 56 |
| 3. Materiál a metody | 62 |
| 3.1. Pokusný materiál, organizace pokusů a podmínky pěstování rostlin | 62 |
| 3.2. Metody..... | 64 |
| 3.2.1. Morfologie a vývoj rostlin | 64 |
| 3.2.2. Relativní obsah vody v listu..... | 65 |
| 3.2.3. Výměna plynů mezi listem a vnějším prostředím | 65 |
| 3.2.4. Obsahy a poměry fotosyntetických pigmentů..... | 66 |
| 3.2.5. Indexy spektrální odrazivosti | 66 |
| 3.2.6. Fluorescence chlorofylu | 66 |
| 3.2.7. Fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů | 68 |
| 3.2.8. Analýza listového proteomu | 69 |
| 3.2.9. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu..... | 71 |
| 3.2.10. Statistická analýza..... | 71 |
| 3.2.11. Kvantitativně genetická analýza | 71 |
| 4. Výsledky | 73 |
| 4.1. Experimentální celek 1 | 73 |
| 4.2. Experimentální celek 2 | 82 |
| 4.3. Experimentální celek 3 | 89 |
| 4.4. Experimentální celek 4 | 104 |
| 4.5. Experimentální celek 5 | 120 |
| 5. Diskuze | 138 |
| 6. Souhrn..... | 153 |
| 7. Seznam použité literatury..... | 154 |
| 8. Přílohy..... | 172 |

Seznam použitých zkratk

Zkratky použité výhradně v popiscích k obrázkům nebo tabulkám zde nejsou uvedeny a jsou vysvětleny přímo u příslušných obrázků/tabulek. Vzhledem k tomu, že řada zkratk je odvozena z anglických termínů, k nimž někdy neexistují české ekvivalenty nebo by nebylo zřejmé, z čeho je zkratka odvozena, uvádím v těchto případech i původní anglické výrazy

| | |
|---------------------|---|
| 1-DGE | jednorozměrná gelová elektroforéza („ 1-dimensional gel electrophoresis “) |
| 2-DGE | dvourozměrná gelová elektroforéza („ 2-dimensional gel electrophoresis “) |
| A | rychlost čisté fotosyntézy („ assimilation rate “) |
| A _{max} | maximální rychlost čisté fotosyntézy při saturační ozáření („ maximum assimilation rate “) |
| A | parametr popisující v kvantitativně-genetickém modelu použitým v této práci aditivní genetický efekt |
| ABA | kyselina abscisová („ abscisic acid “) |
| ABA/EREBP | transkripční faktor uplatňující se v signalizační dráze ABA a rozpoznávající EREB <i>cis</i> -regulační element („ ethylene-responsive element binding protein “) |
| ABS | absorbance |
| ABS/RC | průměrný tok zachycených („ absorbed “) fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII (zdánlivá velikost světlosběrné antény aktivního PSII) |
| ACN | acetonitril |
| ANOVA | analýza variance („ analysis of variance “) |
| AOX | alternativní oxidázová dráha |
| APCI | chemická ionizace za atmosférického tlaku („ atmospheric pressure chemical ionization “) |
| APEX | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která nevyužívá značení („ absolute protein expression “) |
| APX | askorbátperoxidáza |
| AQUA | metoda absolutní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách („ absolute quantification “) |
| AR | aktinické záření při analýze křivek indukce fluorescence chlorofylu („ actinic radiation “) |
| ASI | délka periody mezi kvetením samčích a samičích květů u kukuřice („ anthesis-silking interval “) |
| AWC | index používaný pro stanovení obsahu vody v rostlině („ actual water content “) |
| BWR | efektivita využití vody („ biomass water ratio “) |
| bZIP/AREB | transkripční faktor obsahující bZIP („ basic leucine zipper “) doménu a rozpoznávající AREB („ ABA-responsive element binding “) <i>cis</i> -regulační element |
| C3 | rostliny, u nichž fixace CO ₂ začíná reakcí, při níž se z ribulóza-1,5-bisfosfátu a CO ₂ vytvoří dvě molekuly tříuhlíkaté sloučeniny 3-fosfoglycerátu |
| C4 | rostliny, u nichž fixace CO ₂ začíná reakcí, při níž se z fosfoenolpyruvátu a CO ₂ vytvoří čtyřuhlíkatá sloučenina oxalacetát |
| C _i | mezibuněčná koncentrace CO ₂ („ intercellular CO₂ concentration “) |
| CA | karbonátdehydratáza, dříve anhydráza kyseliny uhličitě („ carbonic anhydrase “) |
| CAT | kataláza („ catalase “) |
| CET | cyklický transport elektronů |
| CID | kolizní disociace iontů při hmotnostní spektrometrii („ collision-induced dissociation “) |
| CIMMYT | mezinárodní centrum pro šlechtění pšenice a kukuřice (ve španělštině „ Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo “) |
| CT | teplota porostu („ canopy temperature “) |
| CTD | rozdíl mezi teplotou porostu a teplotou okolního vzduchu („ canopy temperature depression “) |
| CWSI | index používaný pro stanovení obsahu vody v rostlině („ crop water stress index “) |
| D | délka listu |
| D | parametr popisující v kvantitativně-genetickém modelu použitým v této práci dominantní genetický efekt |
| DCMU | 3-(3',4'-dichlorfenyl)-1,1-dimetylmočovina („3-(3',4'- dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea“) |
| DCPIP | 2,6-dichlorfenolindofenol („2,6- dichlorophenolindophenol “) |
| DFI | index používaný některými autory pro stanovení odolnosti/citlivosti rostlin k suchu, počítaný na základě performančních indexů odvozených z rychlé části křivky indukce fluorescence chlorofylu („ drought factor index “) |
| DHAR | dehydroaskorbátreduktáza |
| DHL | linie vzniklá zdvojením haploidů („ doubled haploid line “) |
| DIGE | diferenční gelová elektroforéza („ difference in gel electrophoresis “) |
| DI ₀ /RC | tok energie disipované PSII, vyjádřený na jedno reakční centrum PSII |
| DMBQ | 2,6-dimetylbenzochinon („2,6- dimethylbenzoquinone “) |
| DMF | N,N-dimetylformamid |
| DML | hmotnost suché biomasy listu („ dry mass of leaf “) |
| DMR | hmotnost suché biomasy kořenů rostliny („ dry mass of roots “) |
| DMS | hmotnost suché biomasy nadzemní části rostliny („ dry mass of shoot “) |
| DMT | hmotnost suché biomasy celé rostliny („ total dry mass of plant “) |
| DREB/CBP | transkripční faktor rozpoznávající DREB („ dehydration-responsive element binding “) <i>cis</i> -regulační element a podobný CREB-vazebnému proteinu („ CREB-binding protein “) |
| DTT | dithiothreitol |
| E | rychlost transpirace |
| EF-Tu | translační elongační faktor („ elongation factor thermo unstable “) |
| EI | elektronová ionizace při hmotnostní spektrometrii |
| eIF | eukaryotický iniciační translační faktor |

| | |
|---------------------|---|
| ELISA | imunologická metoda sloužící k detekci protilátek („enzyme-linked immunosorbent assay“) |
| emPAI | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která nevyužívá značení („exponentially modified protein abundance index“) |
| ESI | elektrosprejová ionizace při hmotnostní spektrometrii |
| EST | DNA marker založený na známé krátké sekvenci exprimovaného genu („expressed sequence tag“) |
| ETR | rychlost transportu elektronů ve fotosyntetickém elektron-transportním řetězci („electron transport rate“) |
| ET ₀ /RC | tok přenosu elektronů („electron transport“) z Q _A na Q _B vyjádřený na jedno reakční centrum fotosystému II |
| F | dceřinná generace („filial generation“) |
| F' | rovnovážná fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu |
| F ₀ | minimální fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu |
| F' ₀ | minimální fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu |
| F _I | fluorescence chlorofylu v čase 60 ms (v inflexním bodě I) |
| F _J | fluorescence chlorofylu v čase 2 ms (v inflexním bodě J) |
| F _K | fluorescence chlorofylu v čase 300 μs (v inflexním bodě K) |
| F _L | fluorescence chlorofylu v čase 150 μs (v inflexním bodě L), |
| F _m | maximální fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu |
| F' _m | maximální fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu |
| F _p | maximální („peak“) fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu |
| F' _q | parametr související s fotochemickým zhášením („quenching“) fluorescence chlorofylu |
| F' _s | rovnovážná („steady state“) fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu |
| F _v | variabilní fluorescence chlorofylu v temnotně adaptovaném stavu |
| F' _v | variabilní fluorescence chlorofylu ve světelně adaptovaném stavu |
| FBPáza | fruktóza-1,6-bisfosfatáza („fructose-1,6-bisphosphatase“) |
| FNR | ferredoxin-NADP ⁺ oxidoreduktáza |
| g _s | vodivost průduchů („stomatal conductance“) |
| GABA | kyselina γ-aminomáselná („gamma amino butyric acid“) |
| GAPDH | 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenáza („glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase“) |
| GEBV | šlechtitelská hodnota založená na analýze celého genomu („genomic estimated breeding value“) |
| GPOX | guaiacolperoxidáza |
| GPX | glutathionperoxidáza |
| GR | glutathionreduktáza |
| GSH | redukována forma glutathionu |
| GSSG | oxidovaná forma glutathionu |
| GST | glutathion-S-transferáza |
| GWS | genomická selekce („genome-wide selection“) |
| HI | sklízňový index („harvest index“) |
| HILEP | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá metabolického značení proteinů izotopy („hydroponic isotope labeling of entire plants“) |
| HILIC | hydrofilní interakční chromatografie („hydrophilic interaction liquid chromatography“), |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie („high-performance liquid chromatography“) |
| HSF | protein regulující transkripci genů pro HSP proteiny („heat stress transcription factor“) |
| HSP | protein tepelného šoku („heat shock protein“) |
| CHAPS | 3-[(3-cholamidopropyl)dimetylamonio]-1-propansulfonát |
| Chl | chlorofyl |
| ICAT | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá značení proteinů po jejich extrakci izotopovými značkami („isotope-coded affinity tags“), |
| ICPL | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá značení proteinů po jejich extrakci izotopovými značkami („isotope-coded protein labels“) |
| IRGA | infračervená analýza plynů („infra-red gas analysis“) |
| IT | iontová past při hmotnostní spektrometrii („ion trap“) |
| iTRAQ | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá značení proteinů po jejich extrakci izotopovými značkami („isobaric tags for relative and absolute quantification“) |
| J | rychlost transportu elektronů ve fotosyntetickém elektron-transportním řetězci |
| J _{max} | maximální rychlost transportu elektronů využitého pro regeneraci RuBP |
| Kar | obsah celkových karotenoidů |
| KPL | koeficient pro výpočet plochy listu |
| LA | plocha listu („leaf area“) |
| LC | kapalinová chromatografie („liquid chromatography“) |
| LDH | celková výška rostlin měřená k nejmladšímu plně vyvinutému listu („height to the last fully developed leaf“) |
| LDN | počet všech plně vyvinutých listů („number of fully developed leaves“) |
| LEA | proteiny typické pro pozdní stádia embryogeneze („late embryogenesis abundant“) |
| LHC | fotosyntetické komplexy světlosběrných antén („light-harvesting complexes“) |
| LIT | typ lineární iontové pasti při hmotnostní spektrometrii („linear ion trap“) |
| LSD | typ <i>post hoc</i> statistického testu mnohonásobného porovnávání („least significant difference“) |
| LTQ | typ lineární iontové pasti při hmotnostní spektrometrii („linear trap quadrupole“) |
| LVN | počet viditelných listů („number of visible leaves“) |
| LWH | celková výška rostlin měřená ke špičce listu viditelného ve vrcholové růžici („height to the leaf in the top whorl of leaves“) |

| | |
|----------------------------|--|
| <i>M</i> | parametr popisující v kvantitativně-genetickém modelu použitém v této práci maternální genetický efekt |
| <i>M</i> ₀ | přibližný počáteční sklon OJIP křivky fluorescenčního přechodového jevu |
| <i>m</i> | parametr popisující v kvantitativně-genetickém modelu použitém v této práci obecný průměr dané populace genotypů |
| <i>m/z</i> | poměr hmotnost/náboj při hmotnostní spektrometrii |
| MABC | zpětné křížení za pomoci markerů („ marker-assisted backcrossing “) |
| MALDI | ionizace laserem za přítomnosti matrice při hmotnostní spektrometrii („ matrix-assisted laser desorption/ionization “) |
| MARS | rekurentní selekce za pomoci markerů („ marker-assisted recurrent selection “) |
| MAS | selekce za pomoci markerů („ marker-assisted selection “) |
| MDA | malondialdehyd |
| MDH | malátdehydrogenáza |
| MDHAR | monodehydroaskorbátreduktáza |
| ME | jablečný enzym („ malic enzyme “) |
| MeV | metylviologen |
| miRNA | typ malé regulační RNA („ microRNA “) |
| MR | modulační (měřicí) záření při analýze křivek indukce fluorescence chlorofylu („ modulating/measuring radiation “) |
| MS | hmotnostní spektrometrie („ mass spectrometry “) |
| MudPIT | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách založená na negelové analýze („ multidimensional protein identification technology “) |
| MYB/MYC | transkripční faktor podobný MYB (onkoprotein vyvolávající myeloblastózu) a MYC (onkoprotein vyvolávající myelocytomatózu) proteinům |
| NAC | transkripční faktor (zkratka je odvozená z názvů tří proteinů s podobnou DNA-vazebnou doménou: NAM – „no apical meristem“, ATAF –, „ <i>Arabidopsis</i> transcription activation factor“ a CUC – „cup-shaped cotyledon“) |
| NDH | NAD(P)H dehydrogenáza |
| NDVI | index používaný pro stanovení obsahu chlorofylu („ normalized difference vegetation index “) |
| NDWI | index používaný pro stanovení obsahu vody v rostlině („ normalized difference water index “) |
| NIL | téměř izogenní linie („ nearly isogenic line “) |
| NPQ | koeficient nefotochemického zhášení („ non-photochemical quenching “) fluorescence chlorofylu |
| NWI | index používaný pro stanovení obsahu vody v rostlině („ normalized water index “) |
| OEC | komplex produkující kyslík v PSII („ oxygen-evolving complex “) |
| OJIP | analýza rychlé části křivky indukce fluorescence chlorofylu (O, J, I, P označují jednotlivé inflexní body křivky) |
| P | rodičovská generace („ parental generation “) |
| <i>p</i> | hladina statistické významnosti („ probability level “) |
| <i>P</i> ₆₈₀ | primární donor elektronů v PSII („ pigment with absorption maximum at 680 nm “) |
| <i>P</i> ₇₀₀ | primární donor elektronů v PSI („ pigment with absorption maximum at 700 nm “) |
| <i>P</i> _N | rychlost čisté fotosyntézy („ net photosynthetic rate “) |
| PAGE | elektroforéza na polyakrylamidovém gelu („ polyacrylamide gel electrophoresis “) |
| PAM | pulsní amplifikovaná modulace („ pulse amplified modulation “) při měření fluorescence chlorofylu |
| PAR | fotosynteticky aktivní záření („ photosynthetically active radiation “) |
| PCP | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která nevyužívá značení („ protein correlation profiling “) |
| PEG | polyetylénglykol |
| PEPC | fosfoenolpyruvátcarboxyláza („ phosphoenolpyruvate carboxylase “) |
| PFS | metoda identifikace proteinů na základě MS analýzy („ peptide fragment sequencing “) |
| PGK | 3-fosfoglycerátkináza (3- phosphoglycerate kinase “) |
| PGR | protein regulující gradient protonů („ proton gradient regulation “) přes tylakoidní membránu a podílející se na cyklickém transportu elektronů kolem fotosystému I |
| <i>PI</i> _{ABS} | performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q _B |
| <i>PI</i> _{TOTAL} | performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSII |
| PIP | akvaporin lokalizovaný v plazmatické membráně („ plasma membrane intrinsic protein “) |
| PMF | metoda identifikace proteinů na základě MS analýzy („ peptide mass fingerprinting “) |
| PPDK | pyruvát,fosfátdikináza („ pyruvate,orthophosphate dikinase “) |
| PRI | index používaný pro stanovení obsahu karotenoidů („ photochemical reflectance index “) |
| PRK | fosforibulokináza („ phosphoribulokinase “) |
| PS | fotosystém („ photosystem “) |
| PSRI | index používaný pro stanovení obsahu chlorofylu („ plant senescence reflectance index “) |
| Q | lineární kvadrupol při hmotnostní spektrometrii („ quadrupol “) |
| Q _A | primární chinonový („ quinone “) akceptor elektronů v PSII |
| Q _B | sekundární chinonový („ quinone “) akceptor elektronů v PSII |
| Q _Y | maximální kvantový výtěžek („ quantum yield “) fotochemické přeměny energie v PSII ve světelně adaptovaném stavu |
| q _E | složka nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu související s procesy regulovanými vznikem pH gradientu přes tylakoidní membránu („ energy quenching “) |
| q _I | složka nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu související s fotoinhibicí („ photoinhibition quenching “) |

| | |
|---------------------|---|
| q _L | koeficient fotochemického zhášení („photochemical quenching “) fluorescence chlorofylu založený na tzv. modelu „jezero“ („ lake “) |
| q _N | koeficient nefotochemického zhášení („non-photochemical quenching “) fluorescence chlorofylu |
| q _P | koeficient fotochemického zhášení („photochemical quenching “) fluorescence chlorofylu založený na tzv. modelu „louže“ („ puddle “) |
| q _T | složka nefotochemického zhášení fluorescence chlorofylu související se stavovými přechody („state transitions quenching “) |
| QIT | kvadrupolová iontová past při hmotnostní spektrometrii („ quadrupol ion trap “) |
| QTL | lokusy podmiňující kvantitativní znak („ quantitative trait loci “) |
| R | odrazivost („ reflectance “) |
| r | Pearsonův korelační koeficient |
| RC | reakční centrum |
| RCA | aktiváza Rubisco („ Rubisco activase “) |
| RE ₀ /RC | tok přenosu elektronů z PSII až na koncové akceptory PSI („ reduction of PSI acceptors “) vyjádřený na jedno reakční centrum PSII |
| Rfd | „vitalitní index“ odvozený při měření křivky indukce fluorescence chlorofylu („ relative fluorescence decrease “) |
| RIA | radioimunoanalýza („ radioimmunoassay “) |
| RIL | rekombinantní inbrední linie („ recombinant inbred line “) |
| ROS | reaktivní formy kyslíku („ reactive oxygen species “) |
| RP | reverzní fáze („ reverse phase “) |
| RPE | ribulóza-5-fosfát-3-epimeráza („ ribulose-5-phosphate-3-epimerase “) |
| RPI | ribóza-5-fosfátizomeráza („ ribose-5-phosphate isomerase “) |
| RSBP | protein sloužící jako chaperon Rubisco („ Rubisco subunit binding protein “) |
| Rubisco | ribulóza-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza („ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase “) |
| RuBP | ribulóza-1,5-bisfosfát („ ribulose-1,5-bisphosphate “) |
| RWC | relativní obsah vody („ relative water content “) |
| SBPáza | sedoheptulóza-1,7-bisfosfatáza („ sedoheptulose-1,7-bisphosphatase “) |
| SCX | kationově výměnná chromatografie („ strong cation exchange chromatography “) |
| SD | směrodatná odchylka („ standard deviation “) |
| SDS | dodecylsulfát sodný („ sodium dodecylsulphate “) |
| SE | střední chyba („ standard error “) |
| SEC | vylučovací chromatografie („ size-exclusion chromatography “) |
| sHSP | malý protein tepelného šoku („ small heat shock protein “) |
| SILAC | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá metabolického značení proteinů izotopy („ stable isotope labeling by amino acids in cell cultures “) |
| SILIP | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá metabolického značení proteinů izotopy („ stable isotope labeling in planta “) |
| SIPI | index používaný při stanovení obsahu karotenoidů („ structure insensitive pigment index “) |
| siRNA | typ malé regulační RNA („ short interfering/small interfering/silencing RNA “) |
| SIWSI | index používaný při stanovení obsahu vody v rostlině („ short wave infrared water stress index “) |
| SLW | specifická hmotnost listu („ specific leaf weight “) |
| SMIRP | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá metabolického značení proteinů izotopy („ subtle modification of isotope ratio proteomic “) |
| SOD | superoxiddismutáza |
| SP | puls saturačního záření při analýze křivek indukce fluorescence chlorofylu („ saturating pulse “) |
| SR | index používaný pro stanovení obsahu chlorofylu („ simple ratio “) |
| SSI | index používaný pro stanovení odolnosti/citlivosti rostlin k suchu („ stress susceptibility index “) |
| STI | index používaný pro stanovení odolnosti/citlivosti rostlin k suchu („ stress tolerance index “) |
| SWC | obsah vody v půdě („ soil water content “) |
| Š | šířka listu |
| TFA | kyselina trifluoroctová („ trifluoroacetic acid “) |
| TIP | akvaporin lokalizovaný v tonoplastu („ tonoplast intrinsic protein “) |
| TKL | transketoláza |
| TL | teplota listu |
| TLA | celková plocha všech alespoň částečně fotosyntetizujících listů („ total leaf area “) |
| TMT | metoda relativní kvantifikace proteinů v proteomických analýzách, která využívá značení proteinů po jejich extrakci izotopovými značkami („ tandem mass tags “) |
| TOF | průletový analyzátor při hmotnostní spektrometrii („ time-of-flight “) |
| TOL | index používaný pro stanovení odolnosti/citlivosti rostlin k suchu („ stress tolerance “) |
| TP ₀ /RC | maximální tok zachycených („ trapping “) excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII |
| TPI | triózafosfátizomeráza („ triosephosphate isomerase “) |
| V _{c,max} | maximální rychlost karboxylace enzymem Rubisco |
| V _I | relativní variabilní fluorescence v inflexním bodě I křivky indukce fluorescence chlorofylu |
| V _J | relativní variabilní fluorescence v inflexním bodě J křivky indukce fluorescence chlorofylu |
| V _{TPU} | limitace fotosyntézy využitím triózafosfátů |
| W | relativní variabilní fluorescence chlorofylu |
| WBI | index používaný při stanovení obsahu vody v rostlině („ water balance index “) |
| WETC | celý fotosyntetický elektron-transportní řetězec („ whole electron-transport chain “) |
| WI | index používaný při stanovení obsahu vody v rostlině („ water index “) |

| | |
|-------------------|---|
| WRKY | transkripční faktor obsahující na N-konci konzervovanou aminokyselinovou doménu WRKY GQK |
| WU | množství dostupné vody (celkové množství vody dostupné pro transpiraci) („water use“) |
| WUE | „okamžitá“ efektivita využití vody, stanovená jako podíl rychlosti čisté fotosyntézy a rychlosti transpirace („water use efficiency“) |
| WUE _i | „vnitřní“ efektivita využití vody, stanovená jako podíl rychlosti čisté fotosyntézy a vodivosti průduchů („intrinsic water use efficiency“) |
| Y _K | hodnota konkrétní měřené charakteristiky u daného genotypu v kontrolních podmínkách |
| \bar{Y}_K | průměr hodnot konkrétní měřené charakteristiky u rostlin všech genotypů hodnoceného souboru v kontrolních podmínkách |
| Y _S | hodnota konkrétní měřené charakteristiky u daného genotypu ve stresových podmínkách |
| \bar{Y}_S | průměr hodnot konkrétní měřené charakteristiky u rostlin všech genotypů hodnoceného souboru ve stresových podmínkách |
| γRC | pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako chlorofyl reakčního centra PSII |
| Δ ¹³ C | diskriminace izotopu uhlíku ¹³ C |
| ΔF | parametr související s fotochemickým zhášením fluorescence chlorofylu |
| δ _{RE0} | účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q _B až na koncové akceptory PSI |
| Φ ₂ | efektivní kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII |
| ΦCO ₂ | kvantová účinnost (výtěžek) fotosyntetické fixace CO ₂ |
| ΦO ₂ | kvantová účinnost (výtěžek) fotosyntetické produkce kyslíku |
| Φ _P | maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII ve světelně adaptovaném stavu |
| Φ _{P0} | maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII v temnotně adaptovaném stavu |
| Φ _{PSII} | efektivní kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII |
| Φ _{D0} | kvantový výtěžek disipace energie zachycené PSII |
| Φ _{E0} | kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q _A na Q _B v PSII |
| Φ _{P0} | maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII |
| Φ _{RE0} | kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z fotosystému II až na koncové akceptory PSI |
| ψ _{E0} | účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q _A na Q _B |
| ψ _{RE0} | účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI |

1. Úvod a cíle práce

Sucho je jedním z nejdůležitějších přírodních fenoménů na Zemi. Jednoznačná definice toho, co je sucho, v podstatě neexistuje, většinou se však přijímá klasifikace sucha na čtyři hlavní kategorie: sucho meteorologické (období abnormálně suchého počasí, které je tak dlouhé, že v postižené oblasti způsobuje vážnou hydrologickou nerovnováhu), sucho hydrologické (období, kdy je podprůměrný obsah vody ve vodních tocích, nádržích, jezerech, zásobárnách podzemní vody a půdě), sucho zemědělské (klimatická odchylka související s takovým nedostatkem srážek, že to negativně ovlivňuje zemědělskou produkci) a sucho socioekonomické (spojující socioekonomické požadavky s faktory meteorologického, zemědělského a hydrologického sucha) (Mishra *et al.* 2010). Vzhledem ke klimatickým změnám, které v současnosti probíhají a které jsou v budoucnu očekávány, je studium sucha a jeho dopadů na přírodu a lidskou společnost v popředí zájmu mnoha vědců z různých oblastí teoretického i aplikovaného výzkumu.

Sucho je dnes hlavní příčinou, která limituje výnos zemědělských plodin. Ztráty vyvolané tímto stresovým faktorem, činí více než 55 % celosvětových ztrát v zemědělské produkci. Světová populace navíc stále roste a zásoby vody dostupné pro zemědělskou produkci se snižují. S tímto problémem je teoreticky možné se vyrovnat několika způsoby: modifikací pěstebních technologií tak, aby došlo k efektivnějšímu hospodaření s vodou, ošetřením rostlin různými látkami, které u nich navodí lepší toleranci k nedostatku vody, přechodem na jiné druhy pěstovaných plodin, které přirozeně vykazují vysokou odolnost k suchu, nebo vyšlechtěním nových odrůd tradičních plodin s lepší odolností k tomuto stresovému faktoru (Lisson *et al.* 2005, Azevedo *et al.* 2011, Davies *et al.* 2011).

Modifikace způsobů pěstování rostlin se většinou týká technologií, které umožňují snížit množství vody používané pro zavlažování nebo zabránit zbytečným ztrátám vody vypařováním. Na umělém zavlažování je sice závislých jen cca 16 % celosvětové zemědělské půdy, z těchto oblastí však pochází přes 40 % celosvětové zemědělské produkce a většinou se jedná o území s vysokou populační hustotou a zároveň častým výskytem zemědělského sucha (Cominelli *et al.* 2013). V oblastech používajících umělé zavlažování je možné přejít např. na tzv. mikrozavlažování, zavlažování předem počítající s určitým deficitem vody („regulated deficit irrigation“) či střídavé zavlažování jedné a druhé poloviny kořenového systému rostlin („partial root drying“) (Pereira *et al.* 2002, Morison *et al.* 2008). Také hospodaření s vodou na plochách, kde se umělá závlaha nepoužívá, je teoreticky možné zefektivnit např. pomocí různých technologií tzv. „dryland farming“ (využívání systému úhorů, mulčování, volba vhodného způsobu orby, používání umělých brázd a prohlubní k snížení odtoku vody po deštích, sběr vody z širší oblasti a její soustředění do obdělávané plochy, snížení evapotranspirace např. výsadbou větrolamů atd.) (Whitmore 2000, Pereira *et al.* 2002). Většina těchto postupů je však zatím relativně nákladná, některé vyžadují rozsáhlá předchozí testování a jejich zavádění se v praxi může setkat s různými problémy.

Aplikace různých látek buď na semena před výsevem (tzv. „seed priming“), nebo přímo na rostliny za účelem zlepšení odolnosti k nedostatku vody může být poměrně perspektivní metodou, jak se s nepříznivým vlivem sucha na zemědělskou produkci vypořádat. Pozitivní výsledky byly v pokusech prováděných v kontrolovaných podmínkách prostředí dosaženy např. aplikací křemíku, látek souvisejících s osmotickým stavem rostliny (KCl, KNO₃, CaHPO₄, glycinbetain, prolin, polyaminy) či rostlinných hormonů (gibereliny, cytokininy, brassinosteroidy, kyselina jasmonová, kyselina salicylová) (Farooq *et al.* 2009). Studií, které se touto problematikou zabývají, je však stále málo a jejich výsledky se někdy dost liší. Před zavedením těchto technologií do zemědělské produkce bude rozhodně třeba dalšího důkladného výzkumu.

Další možností je přejít na pěstování takových druhů rostlin, které jsou zatím v zemědělské produkci minoritní, ale vykazují vysokou přirozenou odolnost k suchu. Doporučovanými plodinami s velmi dobrou odolností k nedostatku vody jsou např. čirok obecný (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), dochan klasnatý (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.), kalužnice křivoklasá (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.), maniok jedlý (*Manihot esculenta* Crantz), vigna čínská (*Vigna unguiculata* (L.) Walpers), vigna podzemní (*V. subterranea* (L.) Verdc.) a vigna zlatá (*V. radiata* (L.) Wilezek), hrachor setý (*Lathyrus sativus* L.) či kajan indický (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). Širší využití těchto tzv. „orphan crops“ je zatím spíše na počátku, protože se někdy nesnadno překonává nedůvěra konzumentů vůči netradičním zemědělským zdrojům. V souvislosti s novými technologiemi molekulárního šlechtění se

nicméně začínají dostávat více do popředí jak odborné veřejnosti, tak praktických šlechtitelů a zemědělců (Naylor *et al.* 2004, Armstead *et al.* 2009, Varshney *et al.* 2012).

Poslední možností, jak se připravit na zemědělské sucho, je vyšlechtění nových kultivarů tradičních plodin, které budou mít lepší odolnost k suchu než ty, které jsou k dispozici nyní. Zvyšování odolnosti plodin k suchu pomocí šlechtění je momentálně zřejmě nejrozšířenějším přístupem, jak vylepšit zemědělskou produktivitu a snížit zemědělské využití vodních zdrojů. Klasické selekční a šlechtitelské postupy jsou však obvykle velmi náročné na práci, čas i prostor. Vzhledem k tomu se hledají jiné možnosti, jak snadno určit stupeň odolnosti/citlivosti různých genotypů k suchu. K tomu je nezbytné mít dobře definované takové parametry, které by byly jednoznačně spojeny s odolností vůči suchu a zároveň splňovaly i další podmínky nutné pro to, aby mohly být využity buď jako tzv. sekundární selekční znaky v klasické selekci a šlechtění, nebo při fenotypizaci v rámci různých postupů spojených s molekulárním šlechtěním (Furber *et al.* 2011, Mir *et al.* 2012, Setter 2012, Tuberosa 2012). Bez důkladného porozumění procesům, kterými rostliny na suchu reagují a brání se proti němu, stanovení takových parametrů ovšem není možné. Tato oblast výzkumu je tedy dlouhodobě v popředí zájmu rostlinných biologů a šlechtitelů zemědělských plodin. Poznatky získávané analýzou jedinců i celých populací rostlin, prováděnou na morfologické, fyziologické, biochemické i molekulární úrovni, jsou dnes již poměrně často využívány ve šlechtitelských programech a v genovém inženýrství pro zesílení odolnosti rostlin k suchu (Farooq *et al.* 2009, Pinheiro *et al.* 2011, Deikman *et al.* 2012, Mir *et al.* 2012). Ačkoli se však studiem vlivu sucha na rostliny vědci zabývají již od nepaměti, stále ještě máme před sebou pouze neúplný obrázek s mnoha bílými místy, na jejichž vyplnění si zřejmě ještě dlouho budeme muset počkat.

Tato práce je součástí širšího projektu studujícího možné příčiny odolnosti k suchu u hospodářsky významných druhů rostlin a mechanismy ovlivňující projev této odolnosti v různých generacích potomstva. Jako modelový objekt byla zvolena kukuřice (*Zea mays* L.), která je jednou z nejdůležitějších zemědělských plodin a zároveň je citlivá již k poměrně mírné intenzitě sucha. Navíc u tohoto rostlinného druhu existuje dostatečně velká genetická variabilita pro toleranci k stresu nedostatkem vody (Bolaños *et al.* 1993, Bänzinger *et al.* 2000, Bruce *et al.* 2002, Betrán *et al.* 2003, Bänzinger *et al.* 2007). Relativně dobře je prostudována reakce kukuřice na sucho v reprodukčním období (Betrán *et al.* 2003, Campos *et al.* 2004). Nedostatek vody během vegetativního období vývoje, především na počátku rostlinného růstu, může však u tohoto rostlinného druhu také významně omezit produkci biomasy a schopnost fotosyntetizovat, a nepřímě tak narušit utváření reproduktivních orgánů a výnosové parametry (Ribaut *et al.* 2009). O příčinách odolnosti/citlivosti k suchu během tohoto vývojového období je u kukuřice dosud známo relativně méně (Bänzinger *et al.* 2007). Navíc se sucho působící v této fázi vývoje rostlin v posledních letech vyskytuje jak u nás v České republice, tak v jiných oblastech stále častěji, proto se náš projekt věnuje vlivu sucha právě u mladých rostlin v rané fázi vegetativního stádia vývoje.

Práce měla tři hlavní cíle. Prvním cílem bylo analyzovat využitelnost vybraných fotosyntetických parametrů pro zjišťování citlivosti k stresu suchem u mladých rostlin kukuřice a pro případnou predikci reakce na sucho u potomků na základě známé reakce jejich rodičů. Druhým úkolem bylo zaměřit se v rámci výše uvedeného projektu na analýzu primárních fotosyntetických procesů v souvislosti s citlivostí/odolností rostlin k suchu. A konečně třetím cílem práce byla analýza reakce listového proteomu na nedostatek vody u vybraných genotypů s kontrastní odolností vůči suchu a jejich kříženců F1 generace, opět zacílená zejména na proteiny účastnící se fotosyntetických procesů, případně proteiny s fotosyntézou úzce související.

2. Literární přehled

2.1. Šlechtění rostlin na odolnost k suchu

Hlavním cílem jakéhokoli šlechtění zemědělsky významných rostlinných druhů je dosáhnout dobrého hospodářského výnosu, obvykle především v kvantitativním (ale často i kvalitativním) smyslu. Při šlechtění rostlin na odolnost k suchu je pochopitelně tento cíl zachován, je však rozšířen o požadavek, aby rostliny byly schopny růst, kvést a vykazovat ekonomický výnos při suboptimální zásobě vody (Farooq *et al.* 2009). Z tohoto hlediska lze jednotlivé genotypy, které jsou výchozím materiálem i výsledkem různých šlechtitelských postupů, rozdělit do čtyř skupin: genotypy, které vynikají jak v optimálních podmínkách, tak v podmínkách sucha (skupina A), genotypy, které vykazují dobré parametry pouze v optimálních podmínkách prostředí (skupina B), genotypy, které se vyznačují dobrou výkonností naopak pouze v nepříznivých podmínkách (skupina C) a konečně genotypy, které mají nízký hospodářský výnos jak ve stresových, tak v optimálních podmínkách (skupina D) (Fernandez 1992). Šlechtitelé v průběhu let navrhli několik různých indexů, podle kterých je možné určit odolnost rostlin k jakémukoli stresovému faktoru a rozlišit výše uvedené čtyři skupiny genotypů (Rosielle *et Hamblin* 1981, Fisher *et Maurer* 1978, Bouslama *et Schapaugh* 1984, Lin *et al.* 1986, Fernandez 1992, Denčić *et al.* 2000, Khalili *et al.* 2013). Všechny tyto indexy jsou založeny na porovnávání výnosu rostlin pěstovaných v kontrolních a stresových podmínkách prostředí a některé z nich vyžadují srovnání reakce příslušného genotypu s průměrnou reakcí širšího genotypového souboru. Šlechtitelským ideálem je pochopitelně získat a/nebo rozpoznat především genotypy patřící do skupiny A, ale zejména pro oblasti, kde sucho přichází zcela pravidelně, je často vhodné šlechtit i genotypy skupiny C. Ty je možné využít i v oblastech nepravidelného sucha, neboť kombinace jejich pěstování s pěstováním genotypů skupiny B umožní zemědělcům dosáhnout alespoň částečně dobrého výnosu, ať už sucho nastane nebo ne.

Zemědělský výnos v podmínkách s omezenou dostupností vody lze podle Passioury (1977), jehož model je dnes v souvislosti s touto problematikou obecně přijímán, vyjádřit jako součin tří hlavních faktorů: sklizňového indexu (HI; „harvest index“), tj. poměru mezi výnosem a celkovou biomasou, dále množství dostupné vody (WU, „water usage“), což bývá obvykle definováno jako celkové množství vody dostupné pro transpiraci, a konečně tzv. efektivitu využití vody (WUE – „water use efficiency“, nebo lépe BWR – „biomass water ratio“; termín WUE se totiž často používá také na čistě fyziologické úrovni, kdy vyjadřuje podíl mezi rychlostí čisté fotosyntézy a rychlostí transpirace – tzv. „okamžitá“ WUE, nebo rychlostí čisté fotosyntézy a vodivosti průduchů – tzv. „vnitřní“ WUE neboli WUE_i). BWR vyjadřuje podíl celkového množství biomasy a vody ztracené transpirací. Je zřejmé, že zvýšení kteréhokoliv z těchto tří faktorů by mělo vést ke zvýšení výnosu a šlechtění jak na vysokou BWR, tak na vysoké WU by mělo přinést pozitivní výsledky. Ve skutečnosti ovšem WU při pěstování zemědělských rostlin neodráží pouze vodu dostupnou pro transpiraci, ale také vodu dostupnou/ztracenou evaporací z půdy, vodu ztracenou odtokem z kořenové zóny nebo z povrchu půdy, případně vodu ztracenou transpirací plevelů, které na poli také mohou růst (Morison *et al.* 2008). BWR by tedy mělo být spíše podílem celkového množství biomasy a součtu všech těchto složek. Fyziologické nebo morfologické charakteristiky rostlin, které vedou k vyššímu WU (např. hlubší nebo bohatší kořenový systém, větší pokrývná plocha porostu snižující evaporaci z půdy) jsou obvykle spojeny s nízkou BWR. Také WUE a WUE_i (které jsou s BWR pochopitelně spojeny) jsou dále závislé na vodivosti průduchů i mezofylu pro vodu a CO₂, různých faktorech ovlivňujících fotosyntetické procesy apod. (Schapendonk *et al.* 1989, Gilbert *et al.* 2011, Gu *et al.* 2012). Zaměřit se při získávání genotypů s dobrým výnosem a zároveň dobrou odolností k suchu především na zvyšování BWR, resp. WUE, jak se někdy doporučuje (Reynolds *et Tuberosa* 2008, Flexas *et al.* 2013), nemusí být ve skutečnosti příliš vhodné (Blum 2005, 2009, Lopes *et al.* 2011).

Šlechtitelské postupy založené na stanovení výnosu nebo celkové biomasy mají u naprosté většiny plodin tu nevýhodu, že jsou náročné na prostor (nutnost rozsáhlých ploch pro pěstování testovaných genotypů), čas (vzhledem k tomu, že výnos je většinou spojen až s produkcí semen, rostliny musejí projít celým vývojem až do konce reprodukční fáze) i práci (sklizeň, vyhodnocování výnosových parametrů). Proto je snaha o nalezení různých fyziologických nebo morfologických charakteristik, které by vykazovaly dobrou a geneticky podmíněnou korelaci s odolností k suchu a zároveň s výnosem, existovala by pro ně u daného rostlinného druhu genetická variabilita a splňovaly by podmínku vysoké dědivosti (Royo *et al.* 2000, Brennan *et Martin* 2007, Brennan *et al.* 2007, Sayar

et al. 2008, Fischer *et al.* 2012, Mir *et al.* 2012). Takové charakteristiky by pak ve šlechtitelských programech mohly být aplikovány různým způsobem. Mohly by být použity přímo jako selekční znaky při výběru vhodných genotypů prováděném již v počátečních generacích křížení (a tudíž by s jejich pomocí mohla být zkrácena celková doba šlechtitelského procesu). Další výhoda by byla spojená s možností jejich stanovení již v dřívějších vývojových fázích rostlin, což by snížilo nároky na čas, ale i na prostor při pěstování na poli, a mohlo by to umožnit testování rostlin např. v nádobových pokusech prováděných v růstových komorách s kontrolovatelnými podmínkami prostředí (to by zvýšilo počet testovacích cyklů za rok a omezilo variabilitu prostředí, nevyhnutelně spjatou s polními pokusy). Pokud by se ukázalo, že se genotypy s různou citlivostí k suchu odlišují v hodnotách příslušného znaku i v nestresových podmínkách prostředí, mohlo by to z celého procesu úplně vyloučit testování v podmínkách simulujících suchu. Kromě toho by měření těchto charakteristik – pokud by bylo rychlé a technicky i finančně nenáročné – také případně umožnilo hodnotit rozsáhlejší soubory genotypů než při hodnocení „klasických“ znaků (Brennan *et al.* 2007, Brennan *et al.* 2007, Reynolds *et al.* 2007, Mir *et al.* 2012). Jiná možnost aplikace těchto charakteristik ve šlechtění na odolnost k suchu je jejich nepřímé využití při hledání molekulárních markerů, lokusů podmiňujících kvantitativní znaky (QTL; „quantitative trait loci“) a kandidátních genů souvisejících s odolností k suchu a použitelných v různých procesech molekulárního šlechtění včetně přípravy transgenických rostlin (Mir *et al.* 2012).

Při hledání vhodných fyziologických a morfologických charakteristik je nutno vzít v úvahu několik kritérií. Musejí samozřejmě splňovat výše uvedené podmínky (tj. korelaci s odolností k suchu a výnosem nejen za stresových, ale pokud možno i za nestresových podmínek, existenci genetické variability a vysokou dědivost). Dále je nutné si předem stanovit, pro jaké konkrétní stresové podmínky bude šlechtění na suchu prováděno. Může se totiž např. stát, že znak související s odolností rostliny k silnému či déletrvajícím suchu je pro ni nevýhodný za mírného stresu a naopak (Tardieu 2012). Podle toho je také třeba nastavit podmínky, v jakých bude testování rostlin prováděno, a vzít v úvahu různé výhody a nevýhody pokusů v polních podmínkách a pokusů v kontrolovaných podmínkách prostředí (růstové komory, skleníky) (Fischer *et al.* 2012, Saint Pierre *et al.* 2012, Tuberosa 2012). Je nutné rovněž posoudit rentabilitu metod a technik používaných pro jejich měření, a to z hlediska časové, pracovní a finanční náročnosti vzhledem k ziskům vyplývajícím z použití příslušných charakteristik jako přímých selekčních nebo fenotypizačních znaků. V ideálním případě by také mělo jít o nedestruktivní parametry, které by zůstávaly stabilní po celou dobu, kdy je měření prováděno (Brennan *et al.* 2007, Fischer *et al.* 2012, Monneveux *et al.* 2012). Především je ale nutné pochopit, jakým způsobem tyto charakteristiky s odolností vůči suchu souvisejí, tj. znát co nej přesněji různé mechanismy a strategie, kterými rostliny na nedostatek vody reagují a brání se proti němu.

2.1.1. Příčiny odolnosti rostlin k suchu

Odolnost rostlin vůči suchu je založena na třech hlavních strategiích (Chaves *et al.* 2003). První z nich je „časový“ únik před suchem prostřednictvím dokončení životního cyklu rostliny před nástupem vodního deficitu v půdě (tzv. „drought escape“). Druhou strategií (tzv. „drought avoidance“) je schopnost předejít dehydrataci buď tím, že rostlina zvýší příjem vody z půdy kořeny, sníží ztráty vody vypařováním z nadzemní části, případně změnou osmotického stavu udrží správný obsah vody v buňkách. Konečně třetí strategií (tzv. „drought tolerance“) je schopnost rostliny vyrovnat se s efekty, které v jejím těle dehydratace vyvolává, a to většinou pomocí *de novo* syntézy nebo zvýšení syntézy různých ochranných proteinů a dalších látek. Striktně vzato, s opravdovou odolností k stresu suchem je spojena pouze třetí strategie, protože první dvě vedou k tomu, že rostlina stresu *de facto* předejde či zabrání. Protože však využívání i těchto strategií vede k tomu, že příslušné druhy/kultivary jsou schopny se na podmínky nedostatku vody lépe přizpůsobit než druhy/kultivary, které je nevyužívají, jsou obvykle mezi příčiny odolnosti k suchu zahrnovány také (Chaves *et al.* 2004, Reddy *et al.* 2004, Bray 2007, Shao *et al.* 2007, Farooq *et al.* 2009, Lopes *et al.* 2011). Z praktického hlediska jsou často dokonce výhodnější, protože využívání charakteristik souvisejících s třetí strategií vede většinou k selekci genotypů, které vykazují dobrý výnos pouze v nepříznivých podmínkách prostředí a nikoli v optimálních podmínkách (tj. genotypů skupiny C, nikoli A) (Araus *et al.* 2012).

Potenciální úspěch strategií, jak čelit stresu suchem, závisí na genetické dispozici rostliny, síle stresu a dalších faktorech, jako je např. vývojové stadium rostliny, ve kterém sucho působí, či spolupůsobení jiného stresoru (nejčastěji kombinace s vysokou ozářeností či teplotou, se zasolením,

případně se zvýšenou koncentrací CO₂, ozónu nebo dalších plynů atd.) (Mittler *et al.* 2010, Tardieu 2012). Intenzita stresu suchem může být jak mírná (relativně krátká perioda sucha s možností následující obnovy normálního metabolismu), tak silná, kdy sucho může být pro rostlinu fatální (velmi suché prostředí s dlouhou periodou vodního deficitu) – a samozřejmě i cokoli mezi tím (Lopes *et al.* 2011). Mírný vodní stres, resp. počátek stresu suchem, představuje mírnou ztrátu vody, která většinou rychle vede k uzavření průduchů a omezení výměny plynů mezi listy a vnějším prostředím. Dochází při něm ke snížení obsahu vody v buňkách, snížení turgoru, snížení vodního potenciálu, omezení buněčné expanze, buněčného dělení, vadnutí a počátečnímu omezení růstu nadzemní části a často i kořenů rostliny (Jaleel *et al.* 2009). Oproti tomu vysušení (dehydratace) při silnějším a déletrvajícím stresu je spojeno s větší ztrátou vody, která může vést k narušení metabolismu a buněčné struktury a nakonec i k zastavení aktivity enzymů katalyzujících různé reakce. Dochází k zastavení fotosyntézy, výrazným změnám celkového metabolismu a nakonec může dojít i k smrti rostliny (Smirnoff 1993, Lawlor *et al.* 2002, Medrano *et al.* 2002, Yordanov *et al.* 2003, Farooq *et al.* 2009).

2.1.1.1. Strategie úniku před suchem

Jeden z mechanismů odolnosti vůči suchu se může projevat tak, že rostliny vlivu tohoto stresového faktoru uniknou zkrácením svého životního cyklu nebo růstové sezóny (Farooq *et al.* 2009). Tato strategie („drought escape“) je typická např. pro řadu pouštních a polopouštních rostlin. U zemědělských plodin se s ní setkáváme vzácněji, protože většina hospodářsky nejvýznamnějších druhů rostlin potřebuje k dosažení reprodukčního období a tedy i výnosu poměrně dlouhou dobu. Záleží nicméně hodně na tom, kdy v příslušné zemědělské oblasti sucho pravidelně nastává. Z tohoto hlediska můžeme rozlišit území tzv. terminálního sucha, kde sucho na rostliny působí především v době, kdy tvoří semena (např. Austrálie či oblasti kolem Středozemního moře), území, kde sucho nastává už před kvetením rostlin (např. některé oblasti Jižní Ameriky), území, která jsou suchu vystavena neustále (např. některé oblasti jihovýchodní Asie a Afriky), a území, kde k suchu dochází střídavě a nedá se předpovědět (Severní Amerika, Evropa, některé oblasti Jižní Ameriky a Asie) (Araus *et al.* 2002). Právě pro území terminálního sucha je v souvislosti s odolností vůči nedostatku vody možné šlechtit některé plodiny i na zkrácení životního cyklu. Vývoj krátkodobějších odrůd je účinnou strategií k minimalizaci ztrát výnosu, protože časnější reprodukční dospělost pomáhá plodinám suchu se vyhnout (Kumar *et al.* 2001). Úspěchů na tomto poli již bylo dosaženo např. v případě pšenice (*Triticum* sp.; Araus *et al.* 2002, Reynolds *et al.* 2005).

Mezi sekundární selekční znaky spojené se šlechtěním na únik před suchem můžeme zařadit např. celkovou ranost a rychlou tvorbu vegetativních orgánů, což rostlinám umožňuje dosáhnout rychleji větší pokryvnosti porostu a zamezit tak ztrátám vody z půdy vypařováním. V tomto směru mají někdy výhodu ozimé formy plodin. Větší semena zase rostlinám poskytují více zásobních látek, takže mohou rychleji růst a dospívat. Důležitá je i schopnost rychlé remobilizace uložených asimilačních produktů (např. fruktanů) během dozrávání semen a s tím spojené morfologické charakteristiky, jako např. dlouhá a tlustá internodia stébla u obilnin (Chaves *et al.* 2003, Reynolds *et al.* 2005, Reynolds *et al.* 2008, Araus *et al.* 2012, Monneveux *et al.* 2012).

Se změnou fenologií souvisejí i některé další parametry, které jsou u některých rostlinných druhů doporučovány jako dobré sekundární selekční znaky při šlechtění na odolnost k suchu. Např. u kukuřice bývá často doporučován parametr ASI („anthesis-silking interval“), tj. délka periody mezi kvetením samčích a samičích květů (např. Bolaños *et al.* 1996, Betrán *et al.* 2003, Campos *et al.* 2004, Lu *et al.* 2011, Araus *et al.* 2012, Ngugi *et al.* 2013). Hodnoty tohoto parametru vykazují negativní korelaci s výnosem za podmínek vodního deficitu (Araus *et al.* 2012, Tuberosa 2012). Rovněž u rýže (*Oryza sativa* L.), pšenice a některých dalších plodin se při šlechtění na odolnost k suchu uvažuje o využití selekce na dobu kvetení (tak, aby kvetení neprobíhalo v době, kdy v uvedené oblasti dochází k nedostatku vody) (Kamoshita *et al.* 2008, Fischer *et al.* 2012, Monneveux *et al.* 2012, Tuberosa 2012).

2.1.1.2. Strategie zabránění stresu suchem

Zabránění stresu suchem („drought avoidance“) je další obrannou strategií rostlin proti vodnímu deficitu. S touto strategií je spojena řada morfologických, anatomických nebo fyziologických přízpůsobení, která se týkají především kořenového systému a listů (Farooq *et al.* 2009).

Odolnost k suchu může významně souviset s kořenovým systémem, který ovlivňuje příjem vody a živin z půdy. Omezení stresu suchem díky rozměrnému kořenovému systému, který zvyšuje možnost zachytit vodu, je jedním ze základních adaptačních mechanismů rostlin proti dehydrataci. Protože rostliny mohou přijímat vodu pouze kořeny, růst kořenů, jejich hustota, proliferace a velikost jsou klíčovou odpovědí rostlin na stres suchem. V některých případech při suchu dochází přímo k inhibici růstu nadzemní části rostliny a indukuje se růst kořenů. Stres suchem často zesiluje alokaci sušiny do kořenů, což může zesílit příjem vody. Zásadní není ovšem pouze kvantita kořenů, ale také jejich kvalita, tj. distribuce a struktura kořenů, která určuje nejefektivnější strategii čerpání vody během sezóny (De Souza *et al.* 1987, Ludlow *et al.* 1990, Farooq *et al.* 2009, Fulda *et al.* 2011, Ji *et al.* 2012).

Jedním z hlavních znaků kořenového systému, který rostlinám umožňuje zvýšit příjem vody z půdy, je délka kořenů, resp. hloubka, kam kořeny v půdě dosáhnou. To ovšem pomáhá pouze v takových půdách, které si v hlubších vrstvách udržují vodu a k vysychání dochází především v jejich horní vrstvě; pro pěstování rostlin v mělkých půdách nemá smysl na tento znak v souvislosti s odolností k suchu šlechtit (Lopes *et al.* 2011, Tardieu 2012, Tuberosa 2012, Wasson *et al.* 2012). Větší hustota kořenů ve spodních vrstvách půdy a menší hustota v horních vrstvách je dalším z parametrů pomáhajícím rostlinám získat vodu z míst, kde i v době sucha přetrvává. Na druhou stranu povrchové kořeny mohou rostlinám umožnit rychle získat vodu v případě, kdy je sucho přerušováno krátkodobými dešťovými srážkami o malé intenzitě (Herrera *et al.* 2012, Wasson *et al.* 2012). Také zvětšená rychlost růstu kořenových vlásků a obecně delší a hustší kořenové vlákno přispívá ke snížení odporu proti pohybu vody z půdy do rostliny. Zvětšený průměr xylémových buněk a snížený radiální odpor proti pohybu vody uvnitř kořene jsou další znaky často spojované s odolností rostlin vůči nedostatku vody (Wasson *et al.* 2012).

Při měření různých kořenových charakteristik se používají buď destruktivní metody založené na prostém vykopávání kořenového systému (zde jsou ovšem velké problémy s tím, jak jej neporušit) případně měření odporu, s jakým lze rostlinu (resp. její kořenový systém) z půdy vytrhnout, nebo nedestruktivní metody založené např. na využití minirhizotronů, detekci radarem pronikajícím půdou, tomografické analýze elektrického odporu půdy, a především v laboratorních podmínkách lze použít různé varianty dvojrozměrné i trojrozměrné obrazové analýzy (Zhu *et al.* 2011, Herrera *et al.* 2012, Wasson *et al.* 2012, Monneveux *et al.* 2013). Naneštěstí však většina těchto přístupů má při praktickém šlechtění pouze omezenou použitelnost, především v případech vyžadujících testování rozsáhlých genotypových souborů a většího počtu jednotlivých rostlin.

Morfologie listů

Co se týče morfologie nadzemní části, rostliny, které využívají strategii vyhnutí se suchu, mají často různě modifikované listy. V některých případech se vyplatí mít tenčí a širší listy, které rychle dosáhnou své konečné velikosti, zajistí větší pokryvnost a sníží tak evaporační ztráty vody z půdy (Reynolds *et al.* 2005, Monneveux *et al.* 2012). Na druhou stranu listy, které jsou menší, obvykle neobsahují tolik průduchů, kterými by mohlo docházet ke ztrátě vody transpirací. Rovněž silnější kutikula, hlubší zanoření průduchů nebo vrstvička vosku na povrchu může vést k omezení ztrát vody z listů (Reynolds *et al.* 2005). Listy, které jsou lesklé nebo mají na svém povrchu větší množství trichomů, zase často lépe odrážejí světlo a zabraňují tak fotoinhibici, která je se stresem suchem druhotně spojená (Chaves *et al.* 2003). U trav je typickým znakem umožňujícím omezit ztráty vody a snižujícím možnost fotoinhibice stáčení listů (Chaves *et al.* 2003, Reynolds *et al.* 2005, Bogale *et al.* 2011, Kadioglu *et al.* 2012). Rostliny při odpovědi na stres suchem často také snižují počet a plochu listů, aby omezily nároky na vodu (Schuppler *et al.* 1998, Chaves *et al.* 2003, Lopes *et al.* 2011). Příčinou poklesu počtu listů může být omezení jejich tvorby nebo jejich opad, který obvykle probíhá od starých k mladším listům. Genotypy, které jsou citlivější k suchu, však obvykle vykazují větší snížení počtu listů než genotypy odolné a ztráta listů sice vede k omezení ztrát vody, ale většinou také k poklesu celkové účinnosti fotosyntézy a následně i tvorby biomasy a výnosu (Da Matta 2004, Rouhi *et al.* 2007, Macar *et al.* 2009, Ji *et al.* 2012). Kromě toho jsou metody používané k hodnocení stáčení listů, opadu nebo celkové plochy listů zatím nepříliš přesné, i když s rozvojem různých technik dálkového průzkumu a metod obrazové analýzy se tato situace v posledních letech postupně zlepšuje (Monneveux *et al.* 2012, White *et al.* 2012).

Fyziologickým mechanismem, jak během sucha omezit ztráty vody z nadzemní části rostliny, je snížení transpirace pomocí regulace otevřenosti průduchů (Farooq *et al.* 2009, Sade *et al.* 2012). Včasné uzavření průduchů je považováno za hlavní mechanismus, který prostřednictvím snížení transpirace zabraňuje dehydrataci a umožňuje rostlinám odolávat nedostatku vody v půdě (Cattivelli *et al.* 2008). Tento proces je vyvolán především zvýšenou syntézou kyseliny abscisové (ABA, „abscisic acid“) v kořenech a jejím transportem do nadzemní části rostliny, kde spouští složité signální dráhy vedoucí k regulaci svěracích buněk (Chaves *et al.* 2009). O signalizaci prostřednictvím ABA a přesných mechanismech, jak tento signál indukuje zavření průduchů, se dnes již poměrně dost ví (Sreenivasulu *et al.* 2012, Daszkowska-Golec *et Szarejko* 2013, Shanker *et al.* 2014). Intenzivně se také studuje, jakým způsobem je tato signalizace propojena s regulačními drahami navozenými rostlinnými hormony (zejména cytokininy, gibereliny a etylénem, ale i auxiny, kyselinou jasmonovou, brassinosteroidy nebo strigolaktony) (Sharp 2002, Daszkowska-Golec *et Szarejko* 2013, Kohli *et al.* 2013). Citlivost průduchů k ABA může být regulovaná i dalšími faktory jako je pH xylémové šťávy, nutriční stav rostliny atd. Na chování průduchů má vliv i vlhkost vzduchu a hydraulická vodivost xylému (Farooq *et al.* 2009).

Existují práce, které prokázaly souvislost mezi obsahem ABA a odolností rostlin k suchu (Pekic *et Quarrie* 1987, Ristic *et Cass* 1991a, b, 1992, Iuchi *et al.* 2001, Setter 2012, Tuberosa 2012). Množství endogenní ABA se dá stanovit relativně jednoduše, obvykle se k tomu používají metody založené na imunodetekci pomocí ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“) nebo RIA („radioimmunoassay“) testů; obě metody mají výhodu v nízkém detekčním limitu, poměrně nízké ceně a možnosti využití v rozsáhlejší měřítku pro testování většího počtu genotypů (Setter 2012). To je dalším důvodem, proč se tento parametr někdy doporučuje jako vhodný sekundární selekční znak při šlechtění na odolnost rostlin k suchu. Záleží však zřejmě na vývojovém stádiu rostliny (množství ABA odráží stres suchem pouze v okamžiku, kdy proběhl odběr vzorků) a orgánu, ze kterého byl vzorek odebrán. Např. u pšenice vykazovaly odolné genotypy vysoký obsah ABA v obilkách na počátku sucha, zatímco citlivé genotypy měly vysoký obsah této látky v pozdějších fázích stresového období (Guóth *et al.* 2009). Existují i studie, které např. u kukuřice dávají do souvislosti vysoký obsah (nebo schopnost akumulovat) ABA a nízký výnos jak v optimálních podmínkách, tak v podmínkách sucha (Araus *et al.* 2012, Tuberosa 2012).

Otevřenost průduchů lze hodnotit na základě tzv. vodivosti průduchů (g_s). I v tomto případě existuje řada prací, které doporučují g_s jako vhodný znak při šlechtění rostlin na odolnost k suchu. Baloch *et al.* (2011) spojují nízké hodnoty g_s s vyšší odolností k suchu u bavlíku (*Gossypium hirsutum* L.). Také u bobu (*Vicia faba* L.) je nízká g_s dávana do souvislosti s lepší odolností k suchu (Khan *et al.* 2007). Studie g_s u rostlin pšenice (Chen *et al.* 2012), sezamu (*Sesamum indicum* L.; Boureima *et al.* 2012) nebo vinné révy (*Vitis vinifera* L.; Bota *et al.* 2001) vystavené vodnímu deficitu již nedávají tak jednoznačné výsledky. Khamssi *et Najaphy* (2012) u pšenice a González *et al.* (2011) u merlíku čilského (*Chenopodium quinoa* Willd.) doporučují pro dobrý výnos v podmínkách sucha spíše genotypy s vyšší g_s . Jamaux *et al.* (1997) nezjistili mezi genotypy slunečnice (*Helianthus annuus* L.) lišícími se odolností k suchu v parametru g_s žádné výrazné rozdíly a podobná situace byla i u bramboru (*Solanum tuberosum* L.; Schafleitner *et al.* 2007).

g_s se dá přímo měřit buď gazometricky (obvykle spolu se stanovením rychlosti výměny CO_2 a vody mezi listem a vnějším prostředím), nebo porometricky (Araus *et al.* 2012). Nevýhodou těchto metod je jejich relativní zdlouhavost a určitá technická náročnost, takže se příliš nehodí pro hodnocení velkého množství genotypů současně. U řady rostlinných druhů však byla prokázána souvislost mezi g_s a teplotou listu, resp. porostu. Měření teploty je mnohem snazší než přímé stanovení g_s ; je většinou založeno na technikách dálkového průzkumu (infračervené termometrii nebo termografii) – teplota porostu (CT, „canopy temperature“), případně přímém měření teploty listu (TL, „leaf temperature“), a k dispozici je mnoho typů přístrojů, které tato měření umožňují (Ahmad *et al.* 1998, Furbank *et Tester* 2011, Mir *et al.* 2012, Tuberosa 2012, Costa *et al.* 2013).

Rozdíl mezi CT a teplotou okolního vzduchu, tzv. CTD („canopy temperature depression“) bývá často doporučován jako sekundární selekční znak a šlechtění na vysoké CTD (tedy nižší CT spojenou s lepším využíváním dostupné vody v podmínkách vodního deficitu) bylo již rutinně zařazeno např. do šlechtitelských programů centra CIMMYT pro zlepšení odolnosti pšenice k suchu (Reynolds *et Trethowan* 2007, Trethowan *et Reynolds* 2007, Condon *et al.* 2008). U pšenice je tato charakteristika zvláště doporučována (Blum *et al.* 1989, Ahmad *et al.* 1998, Rashid *et al.* 1999,

Reynolds *et al.* 2005, 2007, Balota *et al.* 2007, Olivares-Villegas *et al.* 2007, Condon *et al.* 2008, Karimizadeh *et al.* 2011, Talebi 2011, Monneveux *et al.* 2012), i když Royo *et al.* (2000) nezjistili žádnou korelaci mezi odolností genotypů pšenice k suchu a CT. Parametry CTD, CT nebo LT budou ale zřejmě využitelné při šlechtění na odolnost k nedostatku vody i u jiných rostlinných druhů, např. u rýže (Jones *et al.* 2009), kukuřice (Gardner *et al.* 1986, O'Neill *et al.* 2006, Winterhalter *et al.* 2011, Zia *et al.* 2013), čiroku (Chaudhuri *et al.* 1982, Chaudhuri *et al.* 1986), dochanu klasnatého (Singh *et al.* 1983, Chaudhuri *et al.* 1986), cukrové třtiny (*Saccharum officinarum* L.; De Almeida Silva *et al.* 2007, 2011), bavlníku (Hatfield *et al.* 1987), bobu (Khan *et al.* 2007), podzemnice olejné (*Arachis hypogaea* L.; Jongrungrklang *et al.* 2008), sezamu (Boureira *et al.* 2012), bramboru (Stark *et al.* 1991, Monneveux *et al.* 2013) nebo různých druhů brukve (*Brassica* sp.; Kumar *et al.* 1998). Parametr CWSI („crop water stress index“), založený rovněž na srovnání teploty porostu v podmínkách nedostatku vody a teploty porostu v podmínkách s dostatečným zaléváním, se také někdy doporučuje jako ukazatel odolnosti k suchu (Cattivelli *et al.* 2008).

Další možností hodnocení účinnosti transpirace, otevřenosti průduchů a WUE, resp. WUE_i, je analýza diskriminace proti izotopu uhlíku ¹³C (Farquhar *et al.* 1982). Během difúze CO₂ průduchy do listů je dávana přednost „lehčímu“ izotopu ¹²C, takže ve srovnání s okolním vzduchem je poměr ¹³C/¹²C v listech nižší (tento rozdíl se označuje jako Δ¹³C). Sucho většinou vede ke snížení diskriminace proti ¹³C, takže Δ¹³C je méně negativní. Negativní Δ¹³C se tedy často doporučuje jako příznak lepší odolnosti k suchu, vyšší WUE a větší otevřenosti průduchů (Khan *et al.* 2007, Reynolds *et al.* 2007, González *et al.* 2011, Silva *et al.* 2013). Vztah mezi Δ¹³C a odolností k suchu nicméně rozhodně není jednoznačný, existují doklady pro i proti a velmi pravděpodobně je tento parametr spojen s lepší WUE spíše za podmínek velmi silného sucha a nikoli v prostředí mírnějšího vodního deficitu, což je při pěstování rostlin na poli obvyklejší (Leidi *et al.* 1999, Royo *et al.* 2000, Reynolds *et al.* 2005, Morison *et al.* 2008, Lopes *et al.* 2011, Monneveux *et al.* 2012, Tardieu 2012, Tuberosa 2012). Kromě toho metody a techniky používané pro stanovení Δ¹³C nejsou dosud na tak jednoduché úrovni, aby mohly být rutinně používány při testování velkých genotypových souborů. Totéž platí i po analýze diskriminace proti izotopu kyslíku ¹⁸O, která nedávno začala být také doporučována jako znak účinnosti transpirace (voda obsahující ¹⁶O je přednostně vypařována, resp. transpirována, oproti vodě obsahující ¹⁸O) (Sheshshayee *et al.* 2005, Morison *et al.* 2008, Lopes *et al.* 2011).

V souvislosti s regulací průduchů, účinností transpirace a s tím spojenými parametry WUE a WUE_i lze tedy zřejmě konstatovat, že tyto charakteristiky fyziologického stavu rostliny mají při šlechtění na odolnost k suchu své výhody i nevýhody. Genotypy vykazující včasné uzavření průduchů, nižší transpiraci a s tím spojenou vyšší teplotu listu v podmínkách sucha by mohly být více odolné zejména za dlouhého a silného vodního deficitu, protože by měly být schopny snížit hydraulický gradient a ušetřit tak vodu v půdě delší dobu než rostliny s vysokým g_s. Nevýhodou by však mohla být jejich horší schopnost růstu a horší schopnost akumulace biomasy po skončení působení sucha, neboť uzavření průduchů ovlivňuje účinnost fotosyntézy a následně pak produkci biomasy (Lopes *et al.* 2011, Tardieu 2012). Opožděné uzavření průduchů při stresu naopak umožňuje průběh fotosyntézy i během stresu, udržuje se vysoká hydraulická vodivost, a tak jsou zásoby živin přinášeny do nadzemní části rostliny. Riskantnější strategie zanechat průduchy otevřené během působení sucha by tudíž mohla být užitečná během mírného stresu nebo v podmínkách střídání období sucha a normální dostupnosti vody, protože by pak rostliny byly schopny udržet si relativně normální (možná pouze mírně sníženou) růstovou kapacitu. Ačkoli tedy nízká g_s obvykle bývá považována za obecnou odpověď rostlin na suchu a typický znak odolnosti k suchu, pravděpodobně to takto funguje pouze při silném stresu a při používání tohoto parametru jako sekundárního selekčního znaku nebo při fenotypizaci je třeba být opatrný a mít přesně definované cílové podmínky prostředí, na které je selekce/šlechtění zaměřena (Sade *et al.* 2012, Tardieu 2012).

Další ukazatelé vodního stavu listu

S poklesem transpirace způsobeným částečným či úplným uzavřením průduchů jsou spojeny i změny dalších ukazatelů vodního stavu listu, které někdy bývají doporučovány jako znaky spojené s odolností k suchu. Jako charakteristický ukazatel odolnosti k suchu se někdy uvádějí změny hodnot vodního potenciálu v důsledku sucha (Subrahmanyam *et al.* 2006, Sayar *et al.* 2008, Guóth *et al.* 2009, Rahbarian *et al.* 2011, Roostaei *et al.* 2011, Khalili *et al.* 2013, Silva *et al.* 2013), ale jiní autoři zase argumentují, že tento parametr sice lze použít jako ukazatel účinku sucha na rostliny, avšak není vhodný pro určení odolnosti či citlivosti jednotlivých genotypů (Kumar *et al.* 1998, Ricciardi *et al.*

2001, Kościelniak *et al.* 2006). Kromě toho zde hraje negativní roli technická a časová náročnost měření této charakteristiky.

Významným ukazatelem odolnosti k suchu s ohledem na obsah vody v listech rostlin by mohl být také relativní obsah vody (RWC, „relative water content“), který se často výrazně liší mezi odolnými a citlivými genotypy různých druhů rostlin v závislosti na stresu suchem. Např. genotypy cukrové třtiny citlivé k suchu měly prokazatelně nižší RWC listu ve srovnání s odolnými genotypy (De Almeida Silva *et al.* 2011, Cia *et al.* 2012). U rostlin cizrny RWC během sucha poklesl méně u odolného než u citlivého genotypu (Macar *et al.* 2009). Také genotypy hrachu (*Pisum sativum* L.) citlivé k nedostatku vody byly více poškozeny poklesem RWC než odolné genotypy (Upreti *et al.* 2000). RWC byl také významně vyšší u genotypu kukuřice odolného k suchu ve srovnání s citlivým, a to jak ve stresu, tak v kontrolních podmínkách (Moussa *et al.* 2008). Podobná situace byla popsána i u cukrové třtiny (De Almeida Silva *et al.* 2007, 2011) nebo olivovníku (*Olea europaea* L.; Faraloni *et al.* 2011). Rovněž u pšenice (např. Živčák *et al.* 2008, Balouchi 2010, Bogale *et al.* 2011, Geravandi *et al.* 2011, Arjenaki *et al.* 2012, Elham *et al.* 2012), ječmene (*Hordeum vulgare* L.; Khalili *et al.* 2013), nebo čiroku (Xu *et al.* 2000, Ali *et al.* 2009, Mutisya *et al.* 2010, Farshadfar *et al.* 2013) tento parametr bývá doporučován jako doplňková charakteristika odolnosti k suchu. V případě kostřavy rákosovité (*Festuca arundinacea* Schreb.) se RWC jako měřítko lepšího přizpůsobení na podmínky sucha ukázal vhodný pouze v podmínkách mírného vodního deficitu (Ebrahimian *et al.* 2013). U slunečnice se naopak odolné a citlivé genotypy lišily hodnotami poklesu RWC pouze při silném stresu suchem (Painawadee *et al.* 2009). Balouchi (2010) při analýze osmi genotypů pšenice lišících se odolností k suchu nepozoroval žádné výrazné rozdíly v poklesu RWC v důsledku vodního deficitu a podobný výsledek získali i Rahbarian *et al.* (2011) při srovnávání čtyř genotypů cizrny (*Cicer arietinum* L.).

Stanovení RWC je technicky poměrně snadné, i když časově poněkud náročnější; je tedy otázkou, zda lze tento parametr skutečně efektivně využívat při selekci na odolnost k suchu v případě většího množství hodnocených genotypů (Munns *et al.* 2010). Stále častěji se však ukazuje, že obsah vody v rostlině lze měřit i pomocí infračervené spektroskopie a byly definovány různé indexy spektrální odrazivosti založené především na absorpci/odrazivosti v blízké či střední infračervené oblasti spektra (970 nm, 1200 nm, 1450 nm, 1930 nm, 2500 nm), pomocí kterých by se obsah vody měl dát alespoň přibližně odhadnout. Jedná se např. o WBI („water balance index“; Peñuelas *et al.* 1994), WI („water index“; Peñuelas *et al.* 1993), NWI („normalized water index“; Babar *et al.* 2006), NDWI („normalized difference water index“; Gao 1996), SIWSI („short wave infrared water stress index“; Fensholt *et al.* 2003), AWC („actual water content“; Linke *et al.* 2008) a další (Seelig *et al.* 2008a, b, Winterhalter *et al.* 2011). Některé z těchto indexů jsou doporučovány jako selekční parametry při šlechtění na odolnost k suchu např. u pšenice (Royo *et al.* 2000, Babar *et al.* 2006) nebo kukuřice (Winterhalter *et al.* 2011). Odrazivost světla o určité vlnové délce může být měřena buď přímo na listech nebo pomocí snímkování pevnou či pohyblivou kamerou umístěnou nad polem. Tyto metody jsou rychlé, pracovně nenáročné a s postupným zlepšováním příslušné měřicí techniky budou zřejmě stále přesnější a pravděpodobně i nepříliš nákladné (Munns *et al.* 2010, White *et al.* 2012).

Osmoticky aktivní látky

Rostliny mohou vodní stav v buňce vylepšit také úpravou osmotického stavu, případně změnami elasticity buněčné stěny. Snížení osmotického potenciálu buňky je důležitý znak, který slouží k oddálení škod, které by rostlině způsobil nedostatek vody v prostředí. Díky úpravě osmotického stavu se udržuje buněčný turgor a nejrůznější biochemické a fyziologické procesy (Serraj *et al.* 2002, Moussa *et al.* 2008). S úpravou osmotického stavu je spojena akumulace různých osmoticky aktivních látek (osmolytů, kompatibilních solutů). Mezi osmolyty patří především prolin (a některé jiné aminokyseliny jako např. kyselina γ -aminomáselná nebo citrulin), glycinbetain, alaninbetain a další metylované kvartérní amonné sloučeniny, manitol, sorbitol, pinitol, glycerol a další polyoly, rafinóza, trehalóza, glukóza, fruktóza a některé jiné sacharidy, a anorganické ionty (K^+) (Hoekstra *et al.* 2001, Chaves *et al.* 2004, Langridge *et al.* 2006, Valliyodan *et al.* 2006, Christensen *et al.* 2007, Seki *et al.* 2007, Farooq *et al.* 2009, Rodziewicz *et al.* 2014). Kompatibilní soluty či osmolyty neinterferují ani s funkcí ani se strukturou makromolekul, a to ani při vysokých koncentracích (Hoekstra *et al.* 2001).

Prolin je jedním z nejčastěji se vyskytujících kompatibilních solutů, který se akumuluje u rostlin stresovaných suchem (Maggio *et al.* 2002, Szabados *et al.* 2010, Rodziewicz *et al.* 2014, Shanker *et al.* 2014). Obsah této aminokyseliny je často používán jako fyziologicko-biochemický indikátor vodního stresu, a zvýšení koncentrace prolinu by mohlo korelovat s vyšší odolností k suchu u různých rostlinných druhů (Molinari *et al.* 2007, Vendruscolo *et al.* 2007). Studie, které doporučují použití této charakteristiky při šlechtění na odolnost k suchu, byly provedeny např. u kukuřice (Jabeen *et al.* 2008, Moussa *et al.* 2008), pšenice (Geravandi *et al.* 2011, Farshadfar *et al.* 2013), rýže (Chutipaijit *et al.* 2012), čiroku (Sivaramakrishnan *et al.* 1988), cukrové třtiny (Cha-um *et al.* 2012), cizrny (Macar *et al.* 2009, Ulemale *et al.* 2013), slunečnice (Fulda *et al.* 2011), nebo fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.; Türkan *et al.* 2005). V nedávné studii různých metabolitů u kukuřice vystavené nedostatku vody byl sice zjištěn zvýšený obsah prolinu v důsledku sucha, nesouvisel ale nijak s odolností/citlivostí genotypů k tomuto stresovému faktoru (Witt *et al.* 2012). Rovněž Geravandi *et al.* (2011), kteří srovnávali 20 genotypů pšenice lišících se odolností k suchu, sice našli korelaci mezi obsahem prolinu a výnosem v podmínkách sucha, ale ne mezi obsahem prolinu a odolností genotypů vyjádřenou indexem STI („stress tolerance index“). Ani Ebrahimiyan *et al.* (2013) nezjistili ve studii srovnávající 30 genotypů košťavy rákosovité žádný vztah mezi obsahem prolinu a odolností k suchu.

Stanovení obsahu prolinu je technicky relativně snadné (většinou se používá spektrofotometrické stanovení podle Bates *et al.* (1973), i když dnes se stále častěji začínají uplatňovat i metabolomické metody; Shanker *et al.* 2014), ale podobně jako u stanovení obsahu ABA, RWC, vodního potenciálu nebo přímého měření g_s , účinnosti transpirace nebo $\Delta^{13}C$ je časově poněkud náročnější a jeho použitelnost při hodnocení velkého množství genotypů je tudíž diskutabilní. Jako doplňkový znak v případech, kdy se šlechtitel zaměří již pouze na omezený genotypový soubor, jej však patrně lze doporučit.

Co se týče ostatních osmolytů, pozitivní výsledky v souvislosti se šlechtěním na odolnost k suchu přicházejí zatím spíše ze studií provedených na geneticky manipulovaných rostlinách s uměle zvýšenou produkcí těchto látek. Přírozená genetická variabilita v jejich obsahu (jedna z podmínek použití nějaké charakteristiky jako sekundárního selekčního znaku) je zřejmě poměrně malá. Také metody jejich stanovení zatím nevyhovují potřebám rozsáhlých analýz, i když s rozvojem metabolomických technik se tato situace může poměrně brzy změnit (Fernie *et al.* 2009, Setter 2012, Arbona *et al.* 2013, Degenkolbe *et al.* 2013, Rodziewicz *et al.* 2014).

2.1.1.3. Strategie přizpůsobení se na stres suchem

Tato strategie („drought tolerance“) se může uplatnit v podmínkách, kdy v rostlině již došlo k nepříznivým projevům spojeným s vodním stresem. Rostliny se snaží tyto nepříznivé efekty napravit a co možná nejvíce zabránit poškození různých buněčných složek a struktur. Za tím účelem většinou dochází k indukci nebo posílení syntézy různých ochranných proteinů nebo dalších látek. Jednou z nejvýznamnějších složek odolnosti ke stresu suchem u rostlin v rámci strategie „drought tolerance“ je zabránění nadprodukci nebezpečných kyslíkových radikálů a udržení integrity a stability buněčných membrán a dalších buněčných složek prostřednictvím enzymatické a neenzymatické antioxidantní ochrany (Bajji *et al.* 2002, Reddy *et al.* 2004). V buňkách se dále hromadí také různé osmolyty/osmoprotektanty (podrobněji zmíněné v předchozím oddíle), které – kromě toho, že jejich akumulace reguluje příjem vody buňkou – mají stabilizační a ochrannou funkci pro buněčné membrány a enzymy, protože interagují s hydrofóbními proteinovými zbytky a snižují tím rychlost rozkladu proteinů (Hoekstra *et al.* 2001, Serraj *et al.* 2002, Ashraf *et al.* 2007, Farooq *et al.* 2009, Chaves *et al.* 2009). Podobným způsobem se chovají také některé stresové proteiny, především dehydriny, patřící mezi tzv. LEA („late embryogenesis abundant“) proteiny, nebo tzv. malé proteiny tepelného šoku („small heat shock proteins“, sHSPs) (Tripp *et al.* 2009, Hussain *et al.* 2011, Rodziewicz *et al.* 2014). Hromadění poškozených forem proteinů mohou navíc zabraňovat také různé proteázy. Selektivní regulace proteolýzy navíc může přispívat k recyklaci aminokyselin a reorganizaci buněčného metabolismu během stresové odpovědi (Vaseva *et al.* 2012). Na regulaci příjmu/výdeje vody buňkou se dále podílí další typ proteinů – akvaporiny. Změny jejich množství rovněž mohou hrát důležitou úlohu při přizpůsobení se stresu suchem (Hussain *et al.* 2011).

Vodní stres způsobuje uzavírání průduchů, což snižuje CO_2/O_2 poměr v listech a inhibuje fotosyntézu. Tyto podmínky zvyšují hladinu tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS, „reactive oxygen species“), které mohou způsobit vážné poškození rostlinné buňky. Vyvolávají narušení redoxní rovnováhy v buňce, přerušení fotosyntetického nebo respiračního elektron-transportního řetězce a spuštění oxidativního stresu (Mittler 2002, Reddy *et al.* 2004). Mezi ROS se řadí především singletový kyslík $^1\text{O}_2^*$, superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), hydroxylový radikál (OH^{\cdot}), případně perhydroxylový radikál $\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$, peroxidový anion O_2^{2-} a hydroxidový anion OH^- (Arora *et al.* 2002, Gill *et al.* 2010).

ROS vznikají zejména z kyslíku produkovaného fotosyntézou v chloroplastech, ale i při interakci O_2 s redukovánými složkami elektron-transportního řetězce v mitochondriích, a dále v peroxizómech (Fazeli *et al.* 2007). V chloroplastech vzniká singletový kyslík přímým přenosem energie z excitovaného chlorofylu (Chl) na kyslík v základním stavu především v anténě fotosystému (PS) II (Minkov *et al.* 1999). K jeho vzniku dochází také díky přenosu světelné energie absorbované cytochromy nebo Fe-S centry fotosyntetických komplexů na O_2 . Při vlnových délkách záření absorbovaného cytochromy nebo Fe-S centry (350-500 nm) vzniká v izolovaných tylakoidech mnohem více singletového kyslíku než při vlnových délkách fotosyntetického záření (500-700 nm) (Wise 1995). Superoxidový radikál vzniká v chloroplastech přímou redukcí kyslíku Mehlerovou reakcí, a dále může být kyslík redukován i ferredoxin/NADP⁺ oxidoreduktázovým komplexem spojeným s PSI (Arora *et al.* 2002, Gill *et al.* 2010). Enzymatickým či neenzymatickým rozkladem superoxidu zde pak vznikají silné oxidanty a reduktanty H_2O_2 a OH^{\cdot} . Peroxid vodíku je produkován prostřednictvím dismutace superoxidu. Tato reakce může probíhat spontánně, avšak její rychlost je podstatně zvyšována pomocí enzymu superoxidodismutázy (SOD). Hydroxylový radikál se tvoří reakcí mezi H_2O_2 a Fe-S centry redukovánými světlem. Vznik OH^{\cdot} v chloroplastech může být popisován Fentonovou či Haber-Weissovou reakcí, katalyzovanou prostřednictvím železa (Arora *et al.* 2002). Hydroxylový radikál je jedním z nejvíce reaktivních ROS a je odpovědný za většinu toxických projevů kyslíku *in vivo*. Způsobuje poškození DNA, proteinů, lipidů, Chl a většiny dalších organických součástí živé buňky (Bacana *et al.* 1998).

Chloroplasty byly dlouho považovány za hlavní zdroj ROS a také za hlavní místo oxidativního stresu. Také v mitochondriích jsou však produkovány ROS. Molekulární kyslík je tu z 95 % spotřebován přes cytochromoxidázy za vzniku vody, může být ovšem přímo redukován na $\text{O}_2^{\cdot-}$ v oblasti komplexu NADH-dehydrogenázy v respiračním řetězci. Složkou, která je za to pravděpodobně zodpovědná, je flavoprotein či Fe-S centrum. Dalším místem v respiračním řetězci, kde dochází k redukcí O_2 na $\text{O}_2^{\cdot-}$ je oblast ubichinon-cytochromového komplexu (Atkin *et al.* 2009). Také peroxizómy mají oxidativní typ metabolismu, kterým produkují superoxidový radikál. Vzniká minimálně na dvou místech. Jedním z nich je matrix peroxizómu, kde byla jako zdroj superoxidových radikálů určena xantinoxidáza, která katalyzuje oxidaci xantinu a hypoxantinu na kyselinu močovou. Dalším místem je membrána peroxizómu, kde se vyskytuje tzv. malý elektron-transportní řetězec. Během fotorespirace je glykolát v peroxizómech oxidován na glyoxylát, přičemž vzniká H_2O_2 (Quan *et al.* 2008).

Stanovení poškození buněčných součástí (především peroxidace membránových lipidů) v důsledku zvýšené produkce ROS, nebo přímo hladina ROS (hlavně H_2O_2), je poměrně často doporučováno jako vhodný biomarker pro detekci genotypů rostlin odolných k suchu (Shao *et al.* 2005, Geravandi *et al.* 2011, Lata *et al.* 2011, Farshadfar *et al.* 2013). Peroxidace lipidů je děj, kdy ROS atakují polynenasycené mastné kyseliny buněčných membrán, což může vážně poškodit integritu a funkčnost buněk a způsobit nevratné poškození. Nárůst množství volných radikálů vyvolaný suchem ovlivňuje aktivitu lipoxygenázy, která konvertuje C18:2 a C18:3 mastné kyseliny na příslušné hydroxylperoxydy. Poškození mastných kyselin může mít za následek produkci malých uhlovodíkových fragmentů jako je malondialdehyd (MDA) (Bell *et al.* 1991, Sairam *et al.* 2000).

Řada autorů srovnávala některý z těchto parametrů u genotypů různých plodin, lišících se odolností k suchu. Genotypy cukrové třtiny citlivé k suchu např. vykazovaly nejvyšší peroxidaci lipidů a nejvyšší obsah H_2O_2 (Cia *et al.* 2012). Obsah MDA byl významně vyšší u citlivého genotypu kukuřice vystaveného suchu než u odolného genotypu, a to jak u kontrolních, tak u stresovaných rostlin. Obsah H_2O_2 vzrůstal lineárně s rostoucí úrovní vodního stresu u obou genotypů, také však více u citlivého než u odolného (Moussa *et al.* 2008). Chugh *et al.* (2011) pozorovali, že stres

suchem vedl ke zvýšení obsahu H_2O_2 a MDA u citlivých genotypů kukuřice, zatímco u odolných nebyla zaznamenána žádná změna. Na základě množství MDA bylo možné rozlišit od sebe odolné a citlivé genotypy rýže v podmínkách simulujících stres suchem (Chutipaijit *et al.* 2012). Genotypy rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) odolné k suchu vykazovaly nižší stupeň peroxidace lipidů (nižší obsah MDA) než genotypy citlivé (Shamim *et al.* 2013). Mezi dvěma kultivary sezamu, lišícími se odolností k suchu, byly rovněž popsány rozdíly v množství MDA (Fazeli *et al.* 2007). Kultivary pšenice odolné k suchu měly ve srovnání s citlivými kultivary nižší obsah H_2O_2 a nižší stupeň peroxidace lipidů (Sairam *et al.* 1998, Sairam *et al.* Saxena 2000, Singh *et al.* 2012). Také u čiroku vykazoval genotyp citlivý k suchu vyšší stupeň peroxidace lipidů než suchovzdorné genotypy (Jagtap *et al.* Bhargava 1995). Zdá se tedy, že uvedené parametry dobře korelují s odolností k suchu a že nezměněný stupeň peroxidace lipidů a produkce H_2O_2 lze považovat za charakteristický pro odolné genotypy, zatímco zvýšení peroxidace (obsahu MDA) nebo množství H_2O_2 je znakem spojeným s citlivostí k suchu. Biochemické stanovení těchto parametrů je poměrně dobře realizovatelné v laboratorních podmínkách, stejně jako v případě prolinu, jej však lze doporučit spíše pro srovnávání menších genotypových souborů než pro rozsáhlý screening mnoha set genotypů.

Antioxidantní systémy

Pro detoxifikaci ROS používají rostliny mnoho různých antioxidantních systémů. Nacházejí se v buněčných organelách i v cytosolu a můžeme je členit na systémy enzymatické a neenzymatické. Chemické změny, jako je vyšší množství či aktivita různých antioxidantů, jsou běžně řazeny mezi mechanismy, které umožňují rostlinám přizpůsobit se na stres suchem (Reddy *et al.* 2004, Farooq *et al.* 2009, Ahmad *et al.* 2010).

Hlavními antioxidantními enzymy jsou SOD, nacházející se v chloroplastech, mitochondriích, peroxizómech i cytosolu. SOD jsou první obranné enzymy, které konvertují O_2^- na H_2O_2 . Účinkují v součinnosti s askorbátperoxidázami (APX) lokalizovanými v tylakoidních membránách i stromatu chloroplastů, glyoxizómech a cytosolu, dále s monodehydroaskorbátreduktázou (MDHAR) a dehydroaskorbátreduktázou (DHAR), které jsou přítomné v chloroplastech a cytosolu, a s převážně chloroplastovými glutathionreduktázami (GR). APX za pomoci askorbátu redukuje H_2O_2 vytvořený SOD na vodu a monodehydroaskorbát, který přechází na dehydroaskorbát. Ten je redukován zpět na askorbát enzymem DHAR s použitím glutathionu jako reduktantu. Oxidovaný glutathion je následně zredukován GR, přičemž elektrony pro tuto redukci dodává NADPH. Monodehydroaskorbát vzniklý reakcí mezi peroxidem vodíku a askorbátem může být redukován také MDHAR za použití NADPH, avšak při této aktivní redukci monodehydroaskorbátu by mohlo dojít k vyčerpání zásoby NADPH. Glutathion slouží jako reduktant také glutathionperoxidázám (GPX), což jsou další enzymy, které katalyzují přeměnu H_2O_2 na vodu. Nacházejí se v chloroplastech, mitochondriích, cytosolu a endoplazmatickém retikulu. Dismutaci H_2O_2 na vodu a kyslík katalyzují katalázy (CAT), tetramerní enzymy obsahující hem, které jsou hojné zejména v peroxizómech C3 rostlin, kde odstraňují H_2O_2 produkovaný během fotorespirace. Vyskytují se ale i v cytosolu a mitochondriích. Dalšími enzymy, které se účastní zneškodňování H_2O_2 , jsou chloroplastové guaiacolperoxidázy (GPOX), převážně cytosolické glutathion-S-transferázy (GST) a dále chloroplastová, cytosolická a mitochondriální peroxireduktáza a NADP-thioredoxinreduktáza (Mittler 2002, Quan *et al.* 2008, Ahmad *et al.* 2010, Gill *et al.* Tuteja 2010, Rodziewicz *et al.* 2014).

Existuje mnoho prací, které ukazují, že zvýšená aktivita antioxidantních enzymů často koreluje s odolností k oxidativnímu stresu vyvolanému účinkem sucha a je u různých rostlinných druhů charakteristická pro genotypy odolné k suchu. U kukuřice byla taková souvislost naznačena např. pro aktivitu APX (Kolarovič *et al.* 2009, Chugh *et al.* 2011), SOD (Malan *et al.* 1990, Moussa *et al.* Abdel-Aziz 2008) nebo CAT (Chugh *et al.* 2011). Sairam *et al.* (1997a, b, 1998), Sairam *et al.* Saxena (2000), Lascano *et al.* (2001) a Khanna-Chopra *et al.* Selote (2007) ukázali podobný trend pro aktivitu APX, GR či GPOX v listech pšenice, což pro APX potvrdili i Singh *et al.* (2012), kteří dále u odolných kultivarů ve srovnání s citlivými zaznamenali i zvýšenou aktivitu SOD a CAT. Huseynova (2012) prokázala vyšší aktivitu CAT a GR u dvou genotypů pšenice s vyšší odolností k suchu; hladiny SOD se v této studii u odolných genotypů udržovaly na kontrolní úrovni nebo zvyšovaly, zatímco u citlivých genotypů klesaly. Nárůst aktivity APX v důsledku vodního deficitu závisel na vývojovém stádiu rostliny (Huseynova 2012). Na druhou stranu Loggini *et al.* (1999) popsali zvýšení aktivit GR a GPOX v důsledku sucha pouze u kultivaru pšenice citlivějšího k tomuto stresovému faktoru. Také Simova-Stoilova *et al.* (2009) zaznamenali vyšší aktivitu CAT spíše u kultivarů pšenice citlivých

k suchu než u odolných. Genotyp ječmene, vyznačující se lepší tolerancí k nedostatku vody, se od citlivého genotypu lišil zvýšenou aktivitou SOD, ale ne GPOX (Acar *et al.* 2001). V případě rýže se kultivary odolné k suchu vyznačovaly zvýšenou aktivitou SOD a APX a zvýšeným množstvím askorbátu a GSH, zatímco kultivary citlivé k tomuto stresoru měly aktivitu obou enzymů v podmínkách sucha sniženu (Guo *et al.* 2006). Také u cukrové třtiny popsali někteří autoři odlišné aktivity antioxidantních enzymů APX, CAT, GR a GPOX u kultivarů lišících se odolností k suchu, a to jak v kontrolních, tak ve stresových podmínkách (Cia *et al.* 2012). Některé suchovzdorné genotypy široku vykazovaly v podmínkách vodního deficitu zvýšenou aktivitu CAT, jiné SOD a APX (Jagtap *et al.* Bhargava 1995). U cizrny byl zjištěn větší nárůst aktivity GR v listech kultivaru odolného k nedostatku vody a rozdíly mezi citlivým a odolným kultivarem byly pozorovány i pro aktivitu SOD (Macar *et al.* Ekmekçi 2009). Silný stres suchem indukoval zvýšení aktivit SOD, CAT a GPOX v listech dvou genotypů sezamu, přičemž stupeň této indukce byl vyšší u více odolného genotypu (Fazeli *et al.* 2007). Vyšší aktivita SOD a GPOX spojená s lepší odolností k suchu byla popsána i ve studii prováděné na řepce (*Brassica napus* L.); autoři zde navíc jako marker odolnosti k suchu navrhuje i rozdíly v izoformách těchto enzymů (Abedi *et al.* Pakniyat 2010). Pourtaghi *et al.* (2011) doporučují sledování aktivit CAT a GPOX jako znaků souvisejících s odolností k suchu u slunečnice.

Uvedené studie jsou jen výběrem z mnoha prací na toto téma, jejichž autoři používají (nebo přímo doporučují) stanovení aktivit antioxidantních enzymů k charakterizaci genotypů podle jejich odolnosti k suchu. Je nicméně zřejmé, že v tomto ohledu existují jednak mezidruhové rozdíly, jednak rozdíly vyvolané odlišnou intenzitou stresu aplikovaného na rostliny a pravděpodobně i dalšími faktory (vývojové stádium rostlin, způsob simulace vodního deficitu apod.). Navíc tyto práce hodnotí pouze malý počet genotypů (obvykle pouze dva, maximálně deset), což souvisí s poměrně pracnými technikami měření těchto parametrů. I zde tedy platí, že pro rozsáhlou fenotypizaci se tyto parametry příliš nehodí. Budoucnost by však modifikace množství/aktivit antioxidantních enzymů mohly mít v přípravě geneticky modifikovaných rostlin odolných k suchu v rámci molekulárního šlechtění (Ashraf 2010, Cabello *et al.* 2014).

Mezi neenzymatické nízkomolekulární antioxidanty patří především askorbát, glutathion, tokoferoly a tokoentrioly, karotenoidy, flavonoidy a jiné fenolické látky, a dále sem bývá řazen také prolin, terpenoidy, polyaminy a další sekundární metabolity (Ahmad *et al.* 2010, Gill *et al.* Tuteja 2010, Arbona *et al.* 2013, Rodziewicz *et al.* 2014).

Askorbát reaguje s H_2O_2 , ale také s O_2^- , OH^- a lipidovými hydroxyperoxidázami. Představuje hlavní detoxifikační složku vodné fáze a je schopný být donorem elektronů pro široké rozpětí enzymatických i neenzymatických reakcí. Působí zejména jako donor elektronů pro detoxifikaci H_2O_2 katalyzovanou APX, v chloroplastech však funguje askorbát i jako kofaktor violaxantindepoxidázy a tak se podílí na disipaci přebytečné excitační energie v xantofylovém cyklu. Askorbát také regeneruje tokoferol, který zajišťuje ochranu membrány, z tokoferoxylového radikálu (Noctor *et al.* Foyer 1998, Mittler 2002, Shao *et al.* 2009, Ahmad *et al.* 2010, Gill *et al.* Tuteja 2010). Singh *et al.* (2012) prokázali zvýšené množství askorbátu v listech kultivarů kukuřice odolných k suchu, ale ne v listech citlivých genotypů. V jiné práci na kukuřici se množství askorbátu v důsledku sucha zvýšilo jak u odolných, tak u citlivých genotypů, ale tento nárůst byl větší u genotypů odolných k suchu (Chugh *et al.* 2011). Lascano *et al.* (2001) popsali zvýšený obsah askorbátu u suchovzdorného genotypu pšenice. Genotypy rýže odolné k suchu také vykazovaly vyšší obsah askorbátu (Guo *et al.* 2006).

Glutathion se uplatňuje jako antioxidant několika způsoby. V askorbát-glutathionovém cyklu je redukovaný glutathion (GSH) využíván k redukcí dehydroaskorbátu jak enzymaticky, tak neenzymaticky, a je oxidován na GSSG. Změny poměru GSH/GSSG upravují redoxní stav buněk a mohou aktivovat speciální obranný mechanismus pomocí redox-signálního řetězce. Kontrola redoxního stavu je důležitá pro integritu buněčných struktur a pro správnou funkci metabolických drah. Za fyziologických podmínek je v buňce 90 % celkového askorbátu i glutathionu v redukované formě. Toto redukující prostředí v buňkách zabraňuje utváření mezimolekulárních disulfidických vazeb, a tak pomáhá zajistit správnou konformaci a vhodnou aktivitu proteinů (Noctor *et al.* Foyer 1998, Mittler 2002, Shao *et al.* 2009, Ahmad *et al.* 2010, Gill *et al.* Tuteja 2010). Množství GSH bylo v podmínkách vodního deficitu zvýšeno u genotypů rýže vykazujících lepší odolnost k suchu (Guo *et al.* 2006), a obdobná situace byla popsána u pšenice (Lascano *et al.* 2001). V listech kukuřice vystavené nedostatku vody se celkové množství glutathionu zvýšilo více u genotypů citlivých k suchu (Chugh *et al.* 2011).

Další neenzymatické antioxidanty, tokoferoly, jsou základními složkami biologických membrán. Funkce α -tokoferolu spočívá v přerušení řetězové oxidační reakce, jelikož je schopen přímo

opravit lipidové radikály a tak zabránit šíření autooxidace lipidů. Reakce s lipidovými radikály se odehrává v mezifázi membrána-voda, kde α -tokoferol poskytuje lipidovému radikálu H^+ za vzniku tokoperoxylového radikálu. Regenerace zpět na redukovanou formu může být dosaženo askorbátem, GSH či koenzymem Q. Prostřednictvím mechanismu přenosu náboje mohou tokoferoly působit i jako chemické odstraňovače aktivních forem kyslíku. Mezi jejich další funkce patří i stabilizace membránové struktury (Munné-Bosch *et al.* 2002, Munné-Bosch 2005, Ahmad *et al.* 2010, Gill *et al.* 2010).

Karotenoidy jsou skupinou lipofilních pigmentových molekul, které také mohou fungovat v obraně proti zvýšené produkci ROS, a to zejména v souvislosti se vznikem singletového kyslíku a ochranou před fotoinhibicí. β -karoten přítomný v reakčním centru (RC) PSII chrání Chl RC před poškozením tím, že přímo zhasí jeho tripletový stav ($^3Chl^*$) nebo $^1O_2^*$. Xantofyly, které jsou spojeny s polypeptidy světlosběrných anténových komplexů (LHC), snižují vznik $^3Chl^*$ zhasením excitovaného singletového stavu Chl ($^1Chl^*$) a zabraňují tak fotoxidaci. Jsou schopny disipovat přebytek excitační energie v LHC. Tepelná disipace světelné energie prostřednictvím xantofylového cyklu, který je účinnou ochranou před ROS vznikajícími v chloroplastu, je mechanismem, který brání fotooxidačnímu poškození fotosyntetického aparátu. Tento proces spočívá v přeměně violaxantinu přes antheraxantin na zeaxantin, na které se podílejí enzymy xantofylového cyklu – violaxantindeepoxidáza a zeaxantindeepoxidáza. Zvýšení množství xantofylů a aktivace xantofylového cyklu byly pozorovány u řady rostlinných druhů vystavených suchu (Chaves *et al.* 2002, Reddy *et al.* 2004, Shao *et al.* 2009, Ahmad *et al.* 2010, Gill *et al.* 2010).

Biosyntéza flavonoidů, izoflavonoidů a antocyaninů je stimulována mnoha různými stresovými faktory včetně sucha. Tyto látky nebývají v souvislosti se selekcí genotypů odolných k suchu analyzovány příliš často. Balouchi (2010) u pšenice nepozoroval souvislost mezi odolností k suchu a akumulací antocyaninů. U rýže ale obsah antocyaninů pozitivně koreloval s fotosyntetickou účinností a odolností k suchu (Chutipaijit *et al.* 2012).

Rovněž fenylypropanoidy a jejich polymery (ligniny, taniny) jsou u rostlin vystavených nedostatku vody akumulovány v mnoha pletivech a orgánech (Ahmad *et al.* 2010, Rodziewicz *et al.* 2014). U bavlníku byl zaznamenán vyšší obsah polyfenolů v listech genotypu odolného k suchu než v listech citlivého genotypu (Parida *et al.* 2007). Také genotyp kukuřice odolný k suchu akumuloval větší množství fenolických látek v listech, na rozdíl od genotypů se sníženou odolností k tomuto stresoru. Autoři spekulují, že fenoly by v listech mohly absorbovat záření, přeměňovat jej na fluorescenci v modré oblasti a tím chránit Chl před přílišnou excitací a vznikem tripletových stavů (Hura *et al.* 2008).

Polyaminy jako putrescin, spermidin a spermin pravděpodobně také hrají roli v obraně proti zvýšené produkci H_2O_2 v důsledku sucha, i když jejich role v této obraně je někdy zpochybňována. Jsou to nízkomolekulární sloučeniny související s metabolismem aminokyselin a jejich hladiny mohou negativně korelovat s množstvím H_2O_2 a peroxidací lipidů a naopak pozitivně korelovat s aktivitou antioxidantních enzymů a množstvím karotenoidů. Putrescin by také mohl hrát roli ve zpětnovazebné regulaci množství ABA a tím i otvírání/zavírání průduchů za stresu (Gill *et al.* 2010, Arbona *et al.* 2013, Rodziewicz *et al.* 2014).

V mitochondriích rostlin existuje další možnost ochrany před vznikem ROS – alternativní oxidázová dráha (AOX). V této dráze jsou komplexy III a IV respiračního řetězce vynechány a elektrony jsou přímo přenášeny na kyslík. Vytváří se tak tepelná energie místo ATP. AOX má tedy za následek rozpáření oxidativní fosforylace a elektronového transportu. AOX aktivita může být užitečná pro udržování normálních hladin metabolitů a redukce tvorby ROS během stresu (Moore *et al.* 1991, Wagner *et al.* 1997, Mittler 2002, Shugaeva *et al.* 2007, Atkin *et al.* 2009). Hodnocení účinnosti AOX však je zatím jako znak spojený s případnou odolností rostlin vůči suchu spíše opomíjeno a ve velkém měřítku (v rozsáhlejších genotypových souborech) jeho vhodnost pro tyto účely dosud testována nebyla.

Exprese genů pro dehydriny, tj. hydrofilní, termostabilní proteiny bohaté na glycin, je indukovaná během stresu suchem u různých druhů rostlin (Ramanjulu *et al.* 2002, Jiang *et al.* 2002, Chaves *et al.* 2004, Wang *et al.* 2006, Brini *et al.* 2007, Hu *et al.* 2010a, Kosová *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2013, Rodziewicz *et al.* 2014). Syntéza dehydrinů souvisí s obsahem ABA v rostlině, jak pozorovali např. Jing *et al.* (2002). Dehydriny se akumulují spolu s jinými LEA proteiny nejen při odpovědi na suchu, ale i na další typy stresů. LEA proteiny se dělí do šesti skupin, přičemž dehydriny se řadí do skupiny 2 (Vaseva *et al.* 2012). Přesná funkce LEA proteinů není dodnes zcela vyjasněna, předpokládá se však, že by mohly např. vázat molekuly vody k povrchu jiných buněčných proteinů a chránit je tak před dehydratací (Hussain *et al.* 2011). Jsou důležité pro udržování stability membránových proteinů a úpravu buněčného osmotického tlaku. LEA proteiny by mohly také fungovat jako speciální forma molekulárních chaperonů, které by mohly předcházet agregaci jiných proteinů indukovaných vodním stresem (Veeranagamallaiah *et al.* 2011, Vaseva *et al.* 2012).

Téměř všechny stresové faktory včetně sucha indukují tvorbu tzv. proteinů tepelného šoku (HSP). Indukce transkripce těchto proteinů je společná pro všechny živé organizmy. Tyto proteiny s funkcí molekulárních chaperonů jsou rozděleny do pěti skupin podle jejich přibližné molekulární hmotnosti: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 a sHSP, přičemž proteiny řazené do poslední skupiny jsou zřejmě nejvíce zastoupené. V reakci rostlinné buňky na stres suchem se ale uplatňují všechny skupiny HSP (Vaseva *et al.* 2012, Rodziewicz *et al.* 2014). sHSP se dále dělí do šesti tříd podle sekvenční podobnosti a místa jejich výskytu v buňce a uvádí se, že vyšší rostliny mají v rámci těchto šesti tříd minimálně dvacet různých typů sHSP, přičemž v rámci rostlinného druhu může být až čtyřicet variant (Hussain *et al.* 2011, Vaseva *et al.* 2012). Předpokládá se, že diverzifikace těchto proteinů odráží adaptaci na stres vysokou teplotou. Transkripce genů pro sHSP je kontrolována regulačními proteiny nazývanými „heat stress transcription factors“ (HSF) (Scharf *et al.* 2012). sHSP se účastní regulace úprav struktury (skládání) jiných proteinů, protože se vážou na denaturované substráty a udržují je tím ve vhodné konformaci pro následné skládání prostřednictvím sítě dalších molekulárních chaperonů, což ovlivňuje akumulaci proteinů stejně jako jejich lokalizaci a degradaci. sHSP proteiny brání také ireverzibilní agregaci proteinů (Chaves *et al.* 2004, Tripp *et al.* 2009, Rodziewicz *et al.* 2014).

Role různých typů proteáz a jejich inhibitorů (např. cystatinů nebo inhibitorů serinproteáz) v odpovědi rostlinné buňky na nedostatek vody není zatím příliš objasněna. Současný nárůst hladin různých proteáz a inhibitorů proteáz bylo možné pozorovat např. v buňkách rostlin lupiny bílé (*Lupinus albus* L.) vystavených suchu, mechanismus řízení této selektivní regulace množství proteinů ale zůstává zatím neprostudovaným (Pinheiro *et al.* 2005). Sucho zřejmě indukuje množství nebo aktivitu různých vakuolárních proteáz a také proteáz, které jsou součástí proteazómů, ale zda je tento jev spojen s odolností vůči tomuto stresovému faktoru, není zcela jisté (Vaseva *et al.* 2012).

Pohyb vody přes buněčné membrány (cytoplazmatickou membránu a tonoplast) je většinou regulován rodinou proteinových kanálů označovaných jako akvaporiny. Rostliny obsahují mnoho různých typů akvaporinů, rozdělovaných do dvou hlavních skupin – PIP (lokalizované v plazmatické membráně) a TIP (lokalizované v tonoplastu), které se dále dělí na podskupiny. Akvaporiny hrají zcela jistě důležitou roli v buněčné odpovědi na stres suchem, ale zatím na tuto problematiku existují dva protichůdné pohledy: jednak je možné, že rostliny při stresu suchem snižují množství akvaporinů, aby zabránily ztrátám vody z buňky, ale rovněž by naopak zvýšené množství akvaporinů mohlo zvýšit příjem vody do buňky. Experimentální důkazy existují pro oba tyto názory a je také možné, že různé akvaporiny jsou regulovány různým a často i opačným způsobem (Ramanjulu *et al.* 2002, Chaves *et al.* 2004, Hussain *et al.* 2011, Martinez-Ballesta *et al.* 2014).

Analýza ochranných proteinů souvisejících se strategií přizpůsobení se na stres suchem je často součástí studií, které se snaží odhalit molekulární podstatu odolnosti k suchu (viz kap. 2.2). Praktické uplatnění ve šlechtění rostlin však najde zřejmě spíše v tvorbě transgenních rostlin se zvýšenou syntézou dehydrinů či sHSP proteinů a možná také v identifikaci QTL spojených s odolností k suchu (viz kap. 2.1.3). Je ovšem nutné si uvědomit, že v době, kdy rostlina produkuje tyto látky ve větším množství, se už u ní negativní účinky sucha většinou nějak projevují a nevyhnutelně vedou k zemědělským ztrátám. V podmínkách mírného nebo středně silného vodního deficitu nelze při manipulaci s výše uvedenými charakteristikami předpokládat přílišné výhody.

2.1.2. Fotosyntetické parametry ve šlechtění na odolnost k suchu

Zachování schopnosti fotosyntetizovat i za nepříznivých podmínek je obvykle považováno za velmi dobrý ukazatel odolnosti rostlin ke stresu suchem (Cattivelli *et al.* 2008, Morison *et al.* 2008, Lopes *et al.* 2012). S kontrolou ztráty vody prostřednictvím průduchů je úzce spojeno omezení příjmu CO₂ listy a snížení rychlosti čisté fotosyntézy (P_N) a pokles mezibuněčné koncentrace CO₂ (C_i) jsou uváděny jako časný příznak vodního stresu (Reddy *et al.* 2004, Farooq *et al.* 2009, Chaves *et al.* 2009, Lopes *et al.* 2011, Pinheiro *et al.* Chaves 2011). V počátečních stádiích sucha je vliv zavřených průduchů na transpiraci větší než vliv na asimilaci CO₂, avšak s dalším zvýšením vodního deficitu jsou výrazně utlumeny oba procesy. Konkrétní podíl snížení g_s a C_i na poklesu účinnosti fotosyntézy byl během posledních desetiletí již mnohokrát diskutován (Chaves *et al.* 2003, 2009, Reddy *et al.* 2004, Lawlor *et al.* Tezara 2009, Lopes *et al.* 2011, Pinheiro *et al.* Chaves 2011). Převažují názory modelu „stomatal control“, podle něhož fotosyntetická účinnost primárně klesá hlavně kvůli uzavření průduchů spojeného s poklesem g_s . Změnu C_i a její vliv na snížení P_N ale není snadné určit, a to nejen kvůli existenci tzv. „stomatal patchiness“, ale také kvůli roli, kterou při určování koncentrace CO₂ v chloroplastech rostlin hraje vodivost mezofylu (Pospíšilová *et al.* Šantrůček 1994, Chaves *et al.* 2009, Keenan *et al.* 2010, Pinheiro *et al.* Chaves 2011).

Při prodlouženém či silném stresu suchem mají významný vliv na fotosyntetickou fixaci uhlíku také biochemické změny (Lawlor 2002, Lawlor *et al.* Cornic 2002, Medrano *et al.* 2002, Parry *et al.* 2002, Yordanov *et al.* 2003, Chaves *et al.* Oliveira 2004, Reddy *et al.* 2004, Farooq *et al.* 2009, Chaves *et al.* 2009, Lawlor *et al.* Tezara 2009). Poškození ATP-syntázy a s tím spojené snížení fotofosforylace a syntézy ATP by mohlo být jedním z hlavních faktorů limitujících fotosyntézu dokonce již při mírném stresu suchem (Tezara *et al.* 1999, Lawlor *et al.* Cornic 2002, Farooq *et al.* 2009). Mezi další příznaky stresu suchem související s omezením fotosyntézy patří nedostatečná regenerace ribulóza-1,5-bisfosfátu (RuBP), pokles množství nebo inhibice aktivity hlavního enzymu fotosyntetické fixace CO₂, ribulóza-1,5-bisfosfátcarboxylázy/oxygenázy (Rubisco), inhibice aktivázy tohoto enzymu způsobená snížením obsahu ATP, pokles aktivity dalších enzymů fixace uhlíku a metabolismu sacharidů (u C₄ rostlin může navíc docházet i k rozdílné inhibici enzymů C₃ and C₄ cyklů) atd. Některé z těchto změn byly pozorovány už i v raných stádiích stresu suchem (Du *et al.* 1996, Reddy *et al.* 2004, Flexas *et al.* 2006a, b, Borgeat-Triboulot *et al.* 2007, Zhou *et al.* 2007, Bonhomme *et al.* 2009b, Farooq *et al.* 2009, Ghannoum 2009, Aranjuelo *et al.* 2011, Bedon *et al.* 2012).

Inhibice enzymů fotosyntetické fixace uhlíku vede ke snížení množství fotosyntetických asimilátů dostupných pro syntézu různých monosacharidů, oligosacharidů a polysacharidů, zejména škrobu. Aktivita sacharózasyntázy je vodním deficitem výrazně snížena a tak dochází ke změně poměru škrob/sacharóza (Lawlor *et al.* Cornic 2002, Chaves *et al.* Oliveira 2004, Reddy *et al.* 2004). Sacharóza, glukóza a fruktóza jsou důležitou součástí signálních drah indukovaných suchem, změny jejich množství nebo vzájemného poměru tedy sekundárně ovlivňují expresi různých genů a vedou k dalším změnám buněčného metabolismu (Chaves *et al.* 2009).

Primární fotosyntetické procesy jsou většinou považovány za více odolné vůči vodnímu deficitu (Cornic *et al.* Fresneau 2002, Chaves *et al.* 2002, Lawlor *et al.* Cornic 2002, Yordanov *et al.* 2003, Baker *et al.* Rosenqvist 2004, Chaves *et al.* Oliveira 2004, Reddy *et al.* 2004). Pokles účinnosti elektron-transportního řetězce v důsledku sucha se obvykle objevuje až sekundárně a je způsoben nerovnováhou mezi rychlostí produkce NADPH a jeho využití v fotosyntetickém cyklu fixace uhlíku. V důsledku této nerovnováhy dochází k přeredukování fotosyntetického elektron-transportního řetězce a elektrony z PSI jsou častěji předávány na molekulární kyslík za vzniku H₂O₂. Zároveň přebytek excitační energie, nevyužitelné k transportu elektronů, vede k inaktivaci manganového klastru v komplexu produkujícím kyslík (OEC), který je součástí PSII. Tím je inhibována schopnost tohoto komplexu štěpit vodu a předávat tak elektrony primárnímu donoru elektronů v PSII, P₆₈₀. P₆₈₀⁺ s vysokým oxidačním potenciálem se akumuluje, což vede k poškození D1 proteinu, který je jednou z hlavních podjednotek PSII RC. Poškozené D1 proteiny jsou za normálních okolností nahrazovány nově nasyntetizovanými proteiny, ale H₂O₂ inhibuje tuto syntézu, takže k opravě poškozených PSII nemůže dojít. Tento proces se označuje jako fotoinhibice PSII (Murata *et al.* 2007, Takahashi *et al.* Murata 2008).

Hodnocení celkové účinnosti fotosyntézy a některých dílčích složek tohoto procesu bývá velmi často zařazováno mezi fyziologické parametry doporučované jako sekundární selekční znaky nebo znaky vhodné pro fenotypizaci v rámci šlechtění rostlin na odolnost k suchu. Fotosyntetické

charakteristiky, které jsou v této souvislosti nejčastěji zmiňovány, lze rozdělit do tří hlavních kategorií: P_N a některé další parametry založené na měření výměny plynů mezi listem a okolním prostředím, obsah fotosyntetických pigmentů (především Chl) a účinnost primárních fotosyntetických procesů (především PSII) stanovená na základě fluorescence Chl (Munns *et al.* 2010, Furbank *et al.* 2011, Lopes *et al.* 2012). Parametry spojené se sekundárními fotosyntetickými procesy jako takovými (aktivita či obsah enzymů cyklu fixace uhlíku) se obvykle nehodnotí, protože jejich měření je příliš náročné jak technicky, tak časově. Pouze v práci El-Sharkawy *et al.* (2008) jsem našla analýzu aktivity fosfoenolpyruvátcarboxylázy (PEPC), klíčového enzymu C4 cyklu fotosyntetické fixace CO_2 , u 18 genotypů manioku (*Manihot esculenta* L.) pěstovaných v sezónně suché oblasti Jižní Ameriky. Autoři zde konstatovali, že tuto charakteristiku je možné využít k selekci genotypů s dobrým výnosem v podmínkách nedostatku vody, nicméně že její hodnocení přímo v polních podmínkách je pochopitelně obtížné (El-Sharkawy *et al.* 2008).

Publikací, které srovnávají hodnoty fotosyntetických charakteristik u rostlin vystavených vodnímu deficitu a u rostlin pěstovaných v optimálních podmínkách, je nepřehledné množství. Velký počet prací se touto problematikou zabývá i v souvislosti s odlišnou citlivostí/odolností různých druhů nebo genotypů k suchu, nicméně většinou jsou mezi sebou porovnávány maximálně dva genotypy. V dalších odstavcích se věnuji pouze studiím, které analyzovaly nejméně deset odlišných genotypů a mohou být tedy považovány za poměrně reprezentativní práce pro testování využitelnosti těchto charakteristik při praktickém šlechtění rostlin na odolnost k suchu.

2.1.2.1. Charakteristiky založené na měření výměny plynů

Tzv. gazometrická měření, často užívaná při charakterizaci účinnosti fotosyntetických procesů, jsou dnes založena především na principu absorpce záření v infračervené oblasti plynnými molekulami (IRGA, „infra-red gas analysis“). Zatímco molekuly složené ze stejných atomů (O_2 , N_2) v této dlouhovlnné oblasti spektra neabsorbují, heteroatomové molekuly, jako je CO_2 nebo voda, absorbují a dá se tedy určit jejich molární frakce (Long *et al.* 1996). V dnešní době existuje mnoho různých komerčně dodávaných přístrojů pro tato měření, které většinou představují tzv. otevřené systémy. Do komůrky, v níž je umístěn list (část listu) a utěsněním izolován od okolního prostředí, vstupuje určitou, přesně definovanou rychlostí vzduch obsahující CO_2 o známé koncentraci. Jestliže je list vystaven světlu, probíhají v něm fotosyntetické procesy a CO_2 je spotřebováván. Infračervené záření prochází komůrkou a je zachycováno detektorem a rozdíl mezi energií záření zachyceného po určitém čase měření detektorem a záření vstupujícího do komůrky vypovídá o změně koncentrace CO_2 a tudíž o účinnosti fotosyntézy. Opačná situace platí pro vodu, kde díky transpiraci obsahuje vzduch v komůrce více vodních par než vzduch do komůrky přicházející. Protože CO_2 i voda absorbují infračervené záření v přibližně stejné oblasti (kolem 2,7 μm), je nutné pro jejich rozlišení prostředí uvnitř komůrky před měřením vysušit na předem stanovený obsah vody, obvykle za použití chemikálií fungujících jako vysoušeče (Lopes *et al.* 2012).

Průměrná rychlost fotosyntetické spotřeby CO_2 vyjádřená na jednotku plochy listu se označuje jako P_N (často také jako A) a patří spolu s rychlostí transpirace (E) k základním charakteristikám měřeným pomocí gazometrické metody. Z těchto parametrů lze vypočítat g_s a C_i , a dále také WUE a WUE_i . Kromě toho lze také analyzovat křivky odezvy fotosyntézy na různé koncentrace CO_2 (tzv. A/C_i křivky), kdy se P_N měří za podmínek vystavení listu řadě přesně definovaných koncentrací CO_2 . Na základě těchto měření je možné odhadnout maximální rychlost karboxylace enzymem Rubisco ($V_{c,\text{max}}$) neboli aktivitu Rubisco *in vivo*, a dále maximální rychlost transportu elektronů využitého pro regeneraci RuBP (J_{max}), případně limitaci fotosyntézy využitím triázafosfátů (V_{TPU}) (Farquhar *et al.* 1980, Long *et al.* 2003, Lopes *et al.* 2012). V kombinaci s měřením rychlosti temnotní respirace (která se dá stanovit obdobně jako P_N , ale měřením ve tmě) a měřením fluorescence Chl lze také odhadnout vodivost mezofylu (Pons *et al.* 2009). Obdobným způsobem jako při analýze A/C_i je možné měřit i závislost fotosyntézy na různých intenzitách fotosynteticky aktivního záření (PAR). A/PAR křivky (opět v kombinaci s měřeními Chl fluorescence) mohou poskytnout informace o kvantové účinnosti (výtěžku) fotosyntetické fixace CO_2 (ΦCO_2) nebo produkce kyslíku (ΦO_2). Z těchto měření lze rovněž stanovit maximální P_N (A_{max}) při saturační ozáření (Long *et al.* 2003, Lopes *et al.* 2012).

Naprostá většina prací, které testovaly použitelnost gazometrických měření fotosyntézy u větších genotypových souborů, se spokojuje s prostým stanovením P_N (případně C_i , g_s a E). Hodnocení křivek A/C_i jsem našla v pracích Gilbert *et al.* (2011), Gu *et al.* (2012) a Shamim *et al.*

(2013). V první z nich se autoři zabývali hodnocením WUE_i u 11 genotypů sóji vystavených mírnému vodnímu deficitu (nádobové pokusy ve skleníkovém prostředí) a při té příležitosti hodnotili i parametry $V_{c,max}$ a J_{max} . Konstatovali, že genotypy s vyššími hodnotami $V_{c,max}$ vykazovaly výhodu v podmínkách mírného sucha nezávisle na teplotě listu, a doporučují jako vhodnou strategii pro šlechtění sóji odolné k suchu právě výběr genotypů s vysokou fotosyntetickou kapacitou, aby se tak kompenzovaly ztráty fotosyntetické produkce související se snížením g_s (Gilbert *et al.* 2011). Druhá práce sledovala uvedené charakteristiky v souvislosti s QTL pro fotosyntetické parametry u rýže (celkem 13 introgresních linií) při simulaci stresu suchem pomocí polyetylénglykolu (PEG). Rostliny byly pěstovány v hydroponické kultuře ve skleníku a autoři uvádějí, že šlo o mírnou intenzitu stresu. Tato studie ukázala, že genetická variabilita spojená s „fotosyntetickými“ QTL v těchto podmínkách zčásti odráží i variabilitu v parametrech $V_{c,max}$ a J_{max} (týkalo se to zejména jednoho majoritního QTL, ale vývojové stádium rostlin/listu zde hrálo výraznou roli) (Gu *et al.* 2012). Čtyři různé druhy rajčete a 10 genotypů *S. lycopersicum* byly hodnoceny ve studii simulující stres suchem opět pomocí PEG u rostlin pěstovaných v hydroponické kultuře v růstové komoře. Autoři uvádějí, že genotypy odolnější k suchu vykazují vyšší fotosyntetickou účinnost, což je dáno především nižší limitací $V_{c,max}$ (Shamim *et al.* 2013).

Možnost selekce genotypů odolných k suchu pomocí měření P_N byla zkoumána u několika druhů hospodářsky významných rostlin. Bogale *et al.* (2011) sledovali tuto charakteristiku u 18 genotypů pšenice (nádobové pokusy prováděné v Etiopii v podmínkách nedostatku vody) a nenalezli žádnou významnou korelaci mezi výnosem zrna v podmínkách sucha a parametry výměny plynů včetně P_N a C_i . Také další autoři nedoporučují P_N jako vhodný parametr pro selekci pšenice na odolnost k nedostatku vody (pokusy byly prováděny v pouštní oblasti Číny a testováno bylo 90 kultivarů; Chen *et al.* 2012). U bavlníku bylo v polních podmínkách (Španělsko) za nedostatku vody testováno 27 kultivarů a vnitrodruhová variabilita v P_N byla korelována s variabilitou ve výnosu pouze v podmínkách silného stresu suchem, nikoli při mírné intenzitě sucha (Leidi *et al.* 1999). Další práce na bavlníku analyzovala 32 kultivarů pěstovaných v pákistánské oblasti s nízkými přirozenými srážkami a podle výsledků této analýzy je možné parametr P_N měřený na stresovaných rostlinách (ale ne na kontrolních rostlinách s optimálním zásobováním vodou) použít k selekci na dobrý výnos v podmínkách sucha (Ullah *et al.* 2008). Deset klonů kávovníku (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) lišících se odolností k suchu bylo pěstováno v polních podmínkách (Brazílie) bez zalévání a srovnáváno s kontrolními rostlinami. I v této studii se vnitrodruhová variabilita výrazně lišila v závislosti na intenzitě stresu a měření v kontrolních podmínkách dávalo odlišné výsledky než měření ve stresových podmínkách (Silva *et al.* 2013). Rozsáhlá studie provedená v oblasti s nedostatkem vody v Kolumbii na 127 genotypech manioku prokázala významnou korelaci P_N a výnosu kořenů u této plodiny (El-Sharkawy *et al.* 2008). González *et al.* (2011) u 10 kultivarů merlíku čilského testovaných v polních pokusech (pouštní horská oblast Argentiny) konstatovali, že kultivary vyznačující se vyššími hodnotami P_N a A_{max} mají obvykle vyšší výnos v podmínkách sucha, a že P_N je limitováno především otevřeností průduchů. Bota *et al.* (2001) hodnotili 22 kultivarů vinné révy pěstovaných ve Španělsku v optimálních podmínkách i v podmínkách simulujících stres suchem (nádobové pokusy) a jejich seskupení podle hodnot P_N příliš neodpovídalo seskupení podle WUE nebo hodnot vodního potenciálu.

Ačkoli tedy někteří autoři doporučují stanovení P_N jako vhodný selekční/fenotypizační znak při šlechtění rostlin na odolnost k suchu, existují i opačné názory. Je zřejmé, že zde hrají roli mezidruhové rozdíly a jako u většiny ostatních znaků zmíněných v předchozím přehledu, i zde mohou výsledky hodně záviset na konkrétních podmínkách, v nichž jsou měření prováděna (délka, resp. intenzita stresu, vývojové stádium rostlin apod.). Je také třeba vzít v úvahu časovou náročnost těchto měření (pro získání spolehlivých výsledků je obvykle nutné, aby měření jednoho vzorku probíhalo nejméně 15 minut včetně ustanovení rovnovážného stavu v měřící komůrce). Navíc se musí při měření dávat pozor na přesné dodržení konstantních výchozích podmínek a vzít v úvahu i některé další technické problémy s touto analýzou spojené (Long *et al.* 2003, Flexas *et al.* 2007). Výhodou je relativní finanční nenáročnost, kdy je potřeba pouze počáteční finanční investice do pořízení IRGA přístroje (která ovšem bývá větší než náklady na pořízení některého z přístrojů pro stanovení obsahu Chl či měření Chl fluorescence, viz dále); náklady na chemikálie potřebné k vysoušení komůrky a zajištění určité koncentrace CO_2 ve vzduchu vstupujícím do komůrky jsou pak již minimální. Tyto přístroje jsou navíc snadno přenosné a umožňují měření přímo v polních podmínkách.

2.1.2.2. Obsah fotosyntetických pigmentů

Další charakteristikou, která souvisí s fotosyntézou, dá se poměrně snadno hodnotit ve větších genotypových souborech a je doporučována jako vhodný fyziologický znak pro rozlišení genotypů odolných a citlivých k suchu, je obsah Chl, případně obsah karotenoidů. Množství fotosyntetických pigmentů v rostlině (vzorku rostlinného pletiva) se dá stanovit třemi hlavními způsoby. Nejpřesnější metodou (která se ovšem vzhledem k její časové i finanční náročnosti při selekci/fenotypizaci na odolnost k suchu nepoužívá) je separace a kvantifikace jednotlivých typů pigmentů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC, „high-performance liquid chromatography“). Pigmenty musí být předem ze vzorku extrahovány některým z organických rozpouštědel. Touto metodou je možné rozlišit nejen Chl *a* a Chl *b*, ale i jednotlivé typy karotenoidů. Další často užívanou a také poměrně přesnou metodou je spektrofotometrické stanovení obsahu Chl *a* a Chl *b* na základě absorbance ve viditelné oblasti spektra; lze určit také obsah celkových karotenoidů (Kar), ale nelze od sebe odlišit jejich jednotlivé typy. I tato metoda vyžaduje nejprve extrakci pomocí organického rozpouštědla a patří tedy mezi tzv. destruktivní metody. K nedestruktivnímu stanovení obsahu Chl v listech se obvykle používá měření transmitance (poměr intenzity záření, které dopadlo na list a záření, které listem prošlo), resp. absorbance (záporný logaritmus transmitance) záření v červené (kolem 660 nm) a infračervené (kolem 940 nm) oblasti spektra. Pro tato měření je k dispozici několik typů malých „ručních“ přístrojů, které umožňují rychlý, ale nepřiliš přesný (a nedoporučují se pro listy s vysokým obsahem Chl) odhad množství celkového Chl v listu (Richardson *et al.* 2002, Schoefs 2004). Lze hodnotit také tzv. odrazivost (reflektanci; R) záření ve viditelné, ultrafialové a blízké infračervené oblasti spektra a na základě porovnávání R při určitých vlnových délkách stanovit různé indexy spektrální odrazivosti, které rovněž informují o přibližném obsahu fotosyntetických pigmentů v listech. Pro určení obsahu Chl se nejčastěji používají indexy NDVI („normalized difference vegetation index“), SR („simple ratio“) nebo tzv. „red edge“ indexy, pro určení obsahu karotenoidů byly odvozeny indexy PRI („photochemical reflectance index“), SIPI („structure insensitive pigment index“), případně PSRI („plant senescence reflectance index“), přičemž všechny mají své výhody i nevýhody (Sims *et al.* 2002). I pro měření odrazivosti existují jednak malé „ruční“ přístroje, jednak systémy založené na technologiích dálkového průzkumu, a je tudíž možné hodnotit jednotlivé listy, resp. rostliny, nebo celé porosty (Richardson *et al.* 2002, Gitelson *et al.* 2003, Montes *et al.* 2007, Furbank *et al.* 2011).

S obsahem Chl v listech souvisí i tzv. „stay-green“ fenotyp, což je další znak, který bývá u některých rostlinných druhů doporučován pro selekci na odolnost k suchu. Jedná se vlastně o fenotyp opožděné senescence listů, kdy nedochází k rozkladu fotosyntetického aparátu (a úbytku Chl) tak rychle jako u genotypů, které tento fenotyp nevykazují. Rozlišuje se pět základních možností „stay-green“: 1) senescence začíná později, ale její průběh je pak normální; 2) senescence začíná stejně jako u jiných genotypů, ale probíhá pomaleji; 3) senescence probíhá normální rychlostí a v normální době, ale nedochází k rozkladu Chl; 4) Chl je v listech udržen díky rychlé smrti pletiva (většinou v důsledku zmrazení nebo naopak varu); 5) senescence probíhá normální rychlostí a v normální době, dochází k rozkladu Chl, ale „stay-green“ jedinci měli na počátku vyšší obsah Chl než jedinci, kteří tento fenotyp nevykazovali (Thomas *et al.* 2000). Dnes je již identifikováno několik genů, jejichž mutace vedou ke „stay-green“ fenotypu; jedná se především o geny, jejichž produkty katalyzují jednotlivé kroky degradační dráhy Chl, případně o proteiny se stabilizační/vazebnou funkcí a některé transkripční faktory (Thomas *et al.* 2014). „Stay-green“ fenotyp se při šlechtění na odolnost k suchu využívá především u čiroku, případně dohanu klasnatého, zatímco u kukuřice tento fenotyp souvisí zřejmě spíše s využitím dusíku (Tuberosa 2012, Thomas *et al.* 2014).

V publikacích zabývajících se možným využitím stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů jsem se nejčastěji setkala s měřením obsahu celkového Chl pomocí nedestruktivních metod. Největší počet studií věnujících se možnosti selekce genotypů odolných k suchu na základě těchto charakteristik byl proveden na pšenici. Royo *et al.* (2000), kteří testovali 25 genotypů pěstovaných ve Španělsku v polních podmínkách bez umělého zalévání, konstatují, že mezi obsahem celkového Chl stanoveným na základě transmitance záření listy a mezi výnosem zrna není žádný statisticky významný vztah. Také Reynolds *et al.* (2000) v obdobném experimentu prováděném v Mexiku na stejném počtu genotypů nedoporučují tento parametr jako vhodný selekční znak pro selekci na odolnost k suchu (na rozdíl od odolnosti k stresu vysokou teplotou, kde jej naopak doporučují). Tito autoři stanovili navíc i index NDVI a ani tato charakteristika podle nich není pro uvedené účely příliš vhodná. Babar *et al.* (2006) zkoumali různé indexy spektrální odrazivosti včetně NDVI a SR u 30

genotypů pšenice pěstovaných v Mexiku v prostředí s limitovanou záhlavkou a došli k podobnému závěru jako předchozí studie. Ani Geravandi *et al.* (2011) nedoporučují u tohoto rostlinného druhu nedestruktivní stanovení množství Chl v listech jako vhodný selekční znak při šlechtění na odolnost k suchu, a obdobně neurčité výsledky publikovali Farshadfar *et al.* (2013), přičemž obě studie byly prováděny v Íránu v polních podmínkách s omezenou dostupností vody a obě testovaly 20 různých genotypů. Také rozsáhlá studie na 90 kultivarech pšenice realizovaná v pouštní oblasti Číny nevyznívá příliš pozitivně pro použití této charakteristiky jako vhodného fyziologického znaku souvisejícího s odolností k nedostatku vody (Chen *et al.* 2012). Guendouz *et al.* (2013) nezjistili u 10 kultivarů pšenice významný vliv sucha na obsah Chl na rozdíl od výnosových parametrů, doporučují ale měření spektrální odrazivosti v červené (654 nm) a modré (450) oblasti spektra. Na druhou stranu Talebi (2011) při testování 24 genotypů pšenice prokázal pozitivní korelaci mezi obsahem Chl a výnosem v podmínkách sucha (polní pokusy v Íránu bez umělého zavlažování) i normální dostupnosti vody. Také Khamssi *et al.* (2012), kteří studovali 14 genotypů pšenice (opět polní podmínky bez umělého zavlažování, Írán) doporučují měření obsahu celkového Chl na základě transmitance záření listy pro selekci genotypů odolných k suchu.

Poměrně dost prací hodnotících obsah celkového Chl na základě měření transmitance existuje také u podzemnice olejné. Jedná se o práce jednoho kolektivu autorů z Thajska, kteří až na jednu výjimku (Songsri *et al.* 2009) vždy pěstovali své pokusné rostliny v polních podmínkách bez zalévání. Tři z těchto studií (Arunyanark *et al.* 2008, 2009, Songsri *et al.* 2009) byly prováděny na menším (11-12 genotypů), další dvě (Jongrungsklang *et al.* 2008, Songsri *et al.* 2008) na rozsáhlejších (60, resp. 140 genotypů) genotypovém souboru a všechny doporučují uvedenou charakteristiku jako velmi vhodný a snadno měřitelný selekční znak při šlechtění tohoto rostlinného druhu na odolnost k nedostatku vody. Dvě práce se zabývaly využitím obsahu Chl k detekci genotypů odolných k suchu u cizrny. První z nich na základě analýzy souboru 216 genotypů, pěstovaných v polních podmínkách bez umělého zavlažování v Indii, doporučila měření tohoto parametru, avšak pouze ve vývojovém stádiu, kdy dochází k plnění lusků a ve stresových podmínkách (Kashiwagi *et al.* 2010). Druhá práce (Ulemale *et al.* 2013) vznikla také v Indii, v tomto případě byl využit kryt proti dešťovým srážkám a analyzováno bylo pouze 14 genotypů. I zde autoři konstatovali, že stanovení obsahu Chl je vhodným fyziologickým znakem při šlechtění cizrny na odolnost k suchu. Z dalších rostlinných druhů, u kterých byla podobná měření v souvislosti s možným využitím těchto charakteristik při selekci na odolnost k suchu prováděna, lze uvést např. kukuřici, kde Lu *et al.* (2011) doporučují použití indexu NDVI jako vhodného sekundárního selekčního znaku. Tito autoři testovali celkem 550 inbredních linií a pěstovali je v polním prostředí s omezenou dostupností vody v Mexiku. Rozsáhlý genotypový soubor byl analyzován také u čiroku (300 genotypů, polní pokusy, Kansas, USA); genetická variabilita v obsahu Chl stanoveném pomocí měření transmitance zde existovala, souvislost s odolností k suchu však nebyla zcela jednoznačná (Mutava *et al.* 2011). V případě bramboru byla potvrzena pozitivní korelace mezi indexem NDVI a výnosem v podmínkách sucha u souboru 16 kultivarů, mezidruhových kříženců a klonů pěstovaných v pouštní oblasti Peru (Schafleitner *et al.* 2007).

V některých pracích autoři také hodnotili obsah Chl *a*, Chl *b* (případně Kar a poměry těchto pigmentů) spektrofotometrickou analýzou. Paknejad *et al.* (2007) analyzovali obsah celkového Chl v listech u přibližně 30 kultivarů pšenice pěstovaných v polním prostředí (Írán) simulujícím nedostatek vody a uvádějí, že kultivary s vyšším výnosem v podmínkách sucha měly i vyšší obsah Chl. U 20 genotypů pšenice testovaných rovněž v Íránu v polních podmínkách bez zalévání neprokázalo spektrofotometrické stanovení obsahu Chl *a*, Chl *b* a z toho odvozený poměr Chl *a/b* souvislost mezi tímto parametrem a odolností k suchu (Geravandi *et al.* 2011). Ani González *et al.* (2011) u 10 kultivarů merlíku čilského pěstovaných v pouštní oblasti Argentiny nepozorovali korelaci mezi obsahem Chl nebo Kar a výnosem v podmínkách sucha. Arunyanark *et al.* (2008) měřili obsah celkového Chl (vyjádřený na jednotku plochy listu a na celou rostlinu) u 12 genotypů podzemnice olejné lišících se odolností k suchu a pěstovaných v polních podmínkách (Thajsko) simulujících 1/3 nebo 2/3 dostupné vody v půdě. Konstatovali, že tento parametr lze u tohoto rostlinného druhu doporučit jako vhodný znak pro stanovení odolnosti k suchu. V pozdější studii prováděné na 12 genotypech toto zjištění potvrdili (Arunyanark *et al.* 2009). Další autoři (Ebrahimiyan *et al.* 2013) spektrofotometricky stanovili obsah Chl *a*, Chl *b* a Kar a poměry těchto pigmentů u 30 genotypů kostřavy rákosovité. Rostliny byly pěstovány v polních podmínkách (Írán) simulujících mírný, střední nebo silný stres suchem, což mělo vliv i na změny v obsahu fotosyntetických pigmentů. Autoři doporučují využití těchto parametrů jako selekčních znaků především v podmínkách silného stresu suchem (Ebrahimiyan *et al.* 2013).

Z uvedeného přehledu se zdá, že obsah fotosyntetických pigmentů (zejména Chl) je možné jako selekční/fenotypizační znak při šlechtění na odolnost k suchu spíše doporučit, protože splňuje většinu potřebných podmínek a u řady rostlinných druhů je s odolností k nedostatku vody opravdu spojen. I zde nicméně existují práce (zejména na pšenici), které o obecné použitelnosti stanovení obsahu Chl (ať už pomocí některé z přímých nebo nepřímých metod) pro tyto účely pochybují.

2.1.2.3. Charakteristiky založené na měření fluorescence chlorofylu

Hodnocení účinnosti primárních fotosyntetických procesů a některých dalších parametrů na základě měření fluorescence Chl bývá často považováno za výhodný znak pro hodnocení odezvy rostlin na nedostatek vody a pro výběr genotypů odolných k tomuto stresovému faktoru, a to i přesto, že primární fotosyntetické procesy se nepovažují za tak citlivé na sucho, jako procesy spojené s fotosyntetickou fixací CO₂. Základní princip analýzy fluorescence Chl je jednoduchý: energie záření, které je absorbováno fotosyntetickými pigmenty navázanými na LHC, může být buď využita pro fotosyntetickou excitaci elektronů a jejich transport v pigment-proteinových komplexech tylakoidních membrán, vydána jako teplo v rámci některých ochranných procesů, nebo vyzářena jako fluorescence Chl. Jakákoli změna některého z těchto tří procesů se úměrně odrazí na zbývajících dvou. Pokud tedy primární fotosyntetické procesy neprobíhají tak, jak by měly, nebo pokud nefunguje správně ochrana spojená s disipací přebytečné energie formou tepla (např. u stresovaných rostlin), dojde k nárůstu fluorescence Chl, který se dá měřit. Předpokládá se, že většina měřitelné fluorescence Chl pochází z PSII, i když příspěvek PSI zřejmě není zcela zanedbatelný (Franck *et al.* 2002, Baker 2008, Lopes *et al.* 2012, Lazár 2013, Murchie *et al.* 2013, Pfundel *et al.* 2013).

Při měření fluorescence Chl se obvykle vyhodnocují časové záznamy změn fluorescence měřené v jednom místě rostliny, tzv. fluorescenční indukční křivky, i když obrazová analýza fluorescence Chl dnes také nachází stále širší uplatnění (Brestic *et al.* 2013, Murchie *et al.* 2013). Nejčastěji používanou metodou hodnocení fluorescenčních indukčních křivek je metoda založená na pulzní amplitudové modulaci (PAM) fluorescenčního signálu. Měření je prováděno na temnotně adaptovaných listech (adaptace na tmu trvá obvykle 15-30 min, někdy i více, podle druhu rostliny, a může být zajištěna různým způsobem – speciálními klipy přizpůsobenými pro používaný fluorometr, obalením listů materiálem nepropouštějícím světlo, umístěním celých rostlin do tmy, měřením na přechodu noci a dne atp.).

Měření zahajuje paprsek modulačního (měřicího) záření (MR) o slabé intenzitě (cca 0,1 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), který vybudí tzv. minimální fluorescenci Chl v temnotně adaptovaném stavu (F_0), odpovídající situaci, kdy jsou všechna PSII RC „otevřená“, tj. reoxidovaná, schopná přijmout exciton a zahájit fotochemické procesy. Většinou se doporučuje při měření F_0 použít navíc pulz slabého červeného záření o vyšších vlnových délkách (FR), které přednostně excituje PSI a umožní tak maximální oxidaci primárního chinonového akceptoru elektronu v PSII, Q_A (Baker *et al.* 2004, Baker 2008, Lopes *et al.* 2012, Murchie *et al.* 2013). Poté je krátce (≤ 1 s) aplikován paprsek saturačního záření (SP) o vysoké intenzitě (několik tisíc $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), což vede k tomu, že všechna PSII RC přejdou do „zavřeného“ stavu, Q_A jsou plně redukovány a nejsou schopny přijmout další elektrony, fotochemické procesy v PSII tudíž nemohou probíhat a fluorescence Chl se výrazně zvýší. Hodnota fluorescence změřená po tomto SP se označuje jako maximální fluorescence v temnotně adaptovaném stavu (F_m), rozdíl mezi F_m a F_0 jako variabilní fluorescence v temnotně adaptovaném stavu (F_v) a poměr F_v/F_m (označovaný také jako Φ_{P_0} nebo ϕ_{P_0}) jako maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII v temnotně adaptovaném stavu (Roháček 2002, Baker *et al.* 2004, Baker 2008, Lopes *et al.* 2012, Brestic *et al.* 2013, Murchie *et al.* 2013). Pokles hodnoty tohoto poměru, případně nárůst hodnoty F_0 , je u rostlin obvykle spojen se stresem a parametr F_v/F_m se často doporučuje při hodnocení odolnosti/citlivosti různých rostlinných druhů nebo genotypů k abiotickým i biotickým stresorům včetně sucha (Baker 2008, Brestic *et al.* 2013).

Nejjednodušší fluorometry umožňují měřit pouze F_0 a F_m (a z toho počítat odvozené parametry), ale většina přístrojů využívajících PAM metodu pokračuje po SP osvětlením vzorku kontinuálním aktinickým zářením (AR) o střední intenzitě (stovky $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Fluorescence Chl se nyní opět zvýší na tzv. F_p hodnotu reprezentující redukci Q_A . Po několika sekundách však hodnota fluorescence klesá a postupně se dále snižuje, až dosáhne tzv. rovnovážné hodnoty ($F' = F'_s$). Tento pokles se nazývá zhášení fluorescence Chl, trvá několik minut a odráží jednak procesy spojené s fotosyntetickým transportem elektronů v tylakoidní membráně, tvorbou a odebráním takto vzniklých redukčních ekvivalentů, jednak ochranné procesy spojené s disipací přebytečné energie formou tepla.

Podle toho se rozlišuje tzv. fotochemické a nefotochemické zhášení fluorescence Chl. Nefotochemické zhášení fluorescence Chl je regulováno pH gradientem přes tylakoidní membránu, který vzniká díky transportu elektronů a souvisí s ním také protonace PsbS podjednotky PSII a činnost xantofylového cyklu. Další důležitou složkou nefotochemického zhášení je fotoinhibice a tzv. stavové přechody – pohyb některých LHC proteinů od PSII k PSI (Baker 2008, Murchie *et al.* Lawson 2013). Aby bylo možné od sebe tyto dvě složky zhášení fluorescence Chl oddělit, přerušuje se AR perioda obvykle několika dalšími krátkými SP, po nichž hodnota fluorescence vždy vzroste na tzv. maximální fluorescenci ve světelně adaptovaném stavu (F'_m). F'_m je vždy nižší než F_m , protože dochází k nefotochemickému zhášení fluorescence. Rozdíl mezi F'_m a F' se označuje jako F'_q (často také jako ΔF) a reprezentuje fotochemické zhášení fluorescence Chl (Baker *et al.* Rosenqvist 2004, Baker 2008, Murchie *et al.* Lawson 2013). Po vypnutí zdroje AR je obvykle aplikován opět krátký puls FR, který umožní změřit minimální fluorescenci Chl ve světelně adaptovaném stavu (F'_0). Rozdíl mezi F'_m a F'_0 se označuje jako variabilní fluorescence Chl ve světelně adaptovaném stavu (F'_v) a poměr F'_q/F'_m jako maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII ve světelně adaptovaném stavu (někdy se pro tento parametr také používá symbol Q_y nebo Φ_p) (Roháček 2002, Baker 2008, Brestic *et al.* Zivcak 2013, Murchie *et al.* Lawson 2013).

Z výše uvedených hodnot fluorescence se dají vypočítat další odvozené parametry. Jedním z velmi často používaných parametrů je tzv. efektivní kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII ($\Phi_{PSII} = \Phi_2 = \Delta F/F'_m = F'_q/F'_m$), který vypovídá o účinnosti lineárního transportu elektronů PSII. Koeficient fotochemického zhášení q_p , založený na tzv. modelu „louže“ (který předpokládá, že jednotlivé komplexy PSII, resp. jejich LHC, si mezi sebou nemohou předávat excitační energii) se počítá jako F'_q/F'_v a někdy se označuje také jako $\Delta F/F'_v$. Tento koeficient je nepřímo úměrný podílu PSII RC, které jsou „otevřená“ a propojuje maximální a aktuální účinnost PSII. Koeficient fotochemického zhášení q_L , založený na tzv. modelu „jezero“ (který předpokládá energetické spojení mezi jednotlivými PSII komplexy) se počítá jako součin q_p a F_0/F' a umožňuje lépe odhadnout podíl „otevřených“ RC s oxidovaným Q_A . Koeficienty nefotochemického zhášení q_N ($1 - F'_q/F'_v$) a NPQ ($F_m/F'_m - 1$) odrážejí disipaci energie formou tepla, ke které dochází díky různým ochranným procesům (viz výše). Často se můžeme setkat i s parametrem ETR (rychlost transportu elektronů, někdy také označována jako J), počítaným jako $PAR \times \Phi_{PSII} \times 0,84 \times 0,5$, kde PAR představuje intenzitu fotosynteticky aktivního záření dopadajícího na list, 0,84 se používá k vyjádření části tohoto záření, které je listem skutečně absorbováno (někdy se tato hodnota z výpočtu vynechává) a 0,5 představuje rozdělení absorbovaného PAR mezi PSII a PSI (za předpokladu rovnoměrného rozdělení mezi oběma fotosystémy). Existují i další koeficienty, které se ze základních hodnot fluorescence Chl naměřených pomocí PAM fluorometru dají zjistit, výše uvedené jsou ale ty nejběžnější a nejčastěji používané i ve stresových studiích (Maxwell *et al.* Johnson 2000, Roháček 2002, Baker *et al.* Rosenqvist 2004, Baker 2008, Lopes *et al.* 2012, Brestic *et al.* Zivcak 2013, Murchie *et al.* Lawson 2013). Někdy se také používá parametr Rfd, tzv. „vitalitní index“ vyjadřující poměr poklesu fluorescence Chl na rovnovážnou hodnotu a počítaný jako $(F_p - F')/F'$. Ke zjištění hodnoty Rfd nejsou třeba SP během období AR a uvádí se, že hodnoty tohoto parametru měřené za saturační fotosyntetické ozáření dobře korelují s fotosyntetickou účinností fixace CO_2 (Roháček 2002, Lichtenthaler *et al.* 2005, Brestic *et al.* Zivcak 2013).

Po AR periodě může následovat další měření fluorescence Chl ve tmě, které je opět přerušováno krátkými SP pulzy v rozmezí 1-2 minut. Toto měření musí trvat nejméně 20 minut a slouží k tomu, aby se od sebe daly rozeznat jednotlivé složky nefotochemického zhášení fluorescence, konkrétně q_E (související se vznikem pH gradientu přes tylakoidní membránu), q_T (spojená se stavovými přechody – pohybem části LHC proteinů od PSII k PSI) a q_I související s fotoinhibicí PSII (Baker 2008, Brestic *et al.* Zivcak 2013).

Celý výše uvedený popis se týká měření tzv. „pomalé“ kinetiky fluorescence Chl. „Rychlá“ část fluorescenční indukční křivky mezi F_0 a F_m (resp. F_p), tzv. fluorescenční přechodový jev, se ale dá analyzovat ještě podrobněji a tato analýza se označuje jako OJIP analýza fluorescence Chl. Pokud se časová osa zobrazí v logaritmickém měřítku, lze na počátečním rychlém nárůstu fluorescence Chl pozorovat několik inflexních bodů (křivka má typický „polyfázický“ tvar) odpovídajících obvykle časům 2 ms (inflexní bod J a s ním spojená intenzita fluorescence F_J) a 60 ms (inflexní bod I a s ním spojená intenzita fluorescence F_I). Někdy je mezi F_0 (měřenou obvykle v čase 50 μs) a F_J ještě jeden inflexní bod K v čase 300 μs , případně inflexní bod L v čase 150 μs (intenzity fluorescence v těchto časech se označují jako F_K , resp. F_L). Předpokládá se, že fáze J odpovídá v procesu fotosyntetického přenosu elektronů redukcí Q_A , zatímco ve fázi I jsou elektrony již přeneseny v řetězci dále, za PSII (na

plastocyanin) a začíná jejich přenos na koncové akceptory PSI. Z uvedených hodnot fluorescence Chl se na základě tzv. teorie toků energie v biomembránách (Strasser *et al.* 1995, Strasser *et al.* 2000, 2004, Stirbet *et al.* Govindjee 2011, 2012) dá vypočítat mnoho různých parametrů tzv. JIP testu, které vypovídají o procesech spojených s absorpcí fotonů LHC PSII, přenosem elektronů na Q_A , přenosem elektronů mezi Q_A a sekundárním chinonovým akceptorem PSII – Q_B , případně přenosem elektronů až na koncové akceptory PSI (přehled hlavních parametrů JIP testu uvádí např. práce Stirbet *et al.* Govindjee 2011). Kombinací těchto parametrů lze pak dostat tzv. performanční indexy PI_{ABS} a PI_{TOTAL} , které bývají některými autory považovány za velmi citlivé parametry pro detekci změn, k nimž v rostlinách při reakci na různé nepříznivé faktory dochází (Strasser *et al.* 2000, Oukarroum *et al.* 2007, Brestic *et al.* Zivcak 2013). Kromě parametrů JIP testu lze provést tzv. normalizaci částí OJIP křivky, kdy se absolutní hodnoty fluorescence v každém časovém bodě křivky dělí hodnotami F_L , F_J , F_K (podle toho, jaká část křivky se normalizuje; vždy se od všech těchto hodnot odečítá ještě F_0) a získávají se křivky tzv. relativní variabilní fluorescence W . Na základě tohoto lze pak srovnávat např. kontrolní a stresované rostliny a vytvářet křivky diferenční kinetiky, jejichž tvar může vypovídat např. o poškození OEC komplexu PSII, relativní velikosti LHC PSII, energetické propojenosti mezi jednotlivými PSII, velikosti hotovosti (poolu) koncových akceptorů PSI nebo rychlosti redukce těchto akceptorů (Strasser *et al.* Stirbet 1998, Strasser *et al.* 2004, Yusuf *et al.* 2010, Stirbet 2013).

Další možností analýzy fluorescence Chl je využití tzv. zobrazovacích fluorometrů, pomocí kterých lze změny fluorescence hodnotit nikoli v jednom místě listu, ale na ploše, a tím postihnout i prostorovou heterogenitu listu (Barbagallo *et al.* 2003, Oxborough 2004, Morison *et al.* 2008, Woo *et al.* 2008, Gorbe *et al.* Calatayud 2012, Harbinson *et al.* 2012, Brestic *et al.* Zivcak 2013, Murchie *et al.* Lawson 2013). V současnosti se velká pozornost věnuje i možnostem měřit fluorescenci Chl celých porostů pomocí různých technologií dálkového průzkumu; taková měření by bezesporu mohla nalézt výrazné uplatnění v různých šlechtitelských programech, ale zatím jejich širšímu využití brání různé technické překážky (Furbank *et al.* Tester 2011, Fiorrari *et al.* Schurr 2013).

Celá teorie analýzy fluorescence Chl je samozřejmě mnohem složitější, než lze v rámci tohoto přehledu stručně popsat, a matematický základ různých parametrů i jejich biologická interpretace byly a jsou předmětem živé diskuze v odborné literatuře. V současnosti se diskutuje např. o některých modelech spojených s analýzou OJIP přechodového jevu (Stirbet *et al.* Govindjee 2012, Schansker *et al.* 2013, Stirbet 2013), o biologické relevanci parametru NPQ založeného na obvyklém způsobu měření (Ruban *et al.* Murchie 2012, Holzwarth *et al.* 2013), o tom, jak velká část fluorescence Chl ve skutečnosti pochází z PSI a nikoli z PSII (Lazár 2013), o tom, zda je vhodnější provádět měření na temnotně nebo světelně adaptovaných rostlinách (Murchie *et al.* Lawson 2013) aj. Praktické šlechtitele nicméně zajímá především to, zda a jaké fluorescenční parametry mohou ve svých šlechtitelských programech využít a jakou mají tyto parametry vypovídající hodnotu o znacích, které jsou důležité ze zemědělského hlediska (výnos, produkce biomasy, celková fotosyntetická účinnost, odolnost k stresorům atp.). V souvislosti se šlechtěním rostlin na odolnost k suchu existuje řada studií, které se využitelností některých charakteristik fluorescence Chl u různých rostlinných druhů zabývají. Výsledky studií, které takto analyzovaly alespoň 10 genotypů, uvádím v dalších odstavcích. Většina autorů použila PAM metodu měření fluorescence Chl, někteří i OJIP analýzu. Využití obrazové analýzy fluorescence Chl pro hodnocení větších genotypových souborů s ohledem na citlivost/odolnost k nedostatku vody jsem u hospodářsky významných plodin nenalezla.

Stejně jako v případě stanovení obsahu Chl, i fluorescenční charakteristiky byly měřeny především na pšenici. Araus *et al.* (1998) sledovali 177 genotypů pěstovaných v suchých podmínkách severozápadní Sýrie a konstatovali, že hodnota F_0 může na rozdíl od F_v/F_m parametru sloužit jako dobré měřítko odolnosti/citlivosti k suchu. Další autoři naopak doporučují F_v/F_m parametr, stejně jako základní hodnoty fluorescence F_m a F_v , jako vhodné charakteristiky pro predikci výnosu pšenice v suchých podmínkách Středomoří; pracovali přitom s 25 kultivary pšenice (Royo *et al.* 2000). Také Paknejad *et al.* (2007), kteří testovali přibližně 30 genotypů této plodiny v prostředí Íránu, doporučují jak F_v , tak F_v/F_m jako dobré indikátory výnosu v podmínkách nedostatku vody a nejslabší korelaci s výnosem našli pro parametr F_0 . Obdobný závěr učinili Sayar *et al.* (2008), kteří hodnotili parametr F_v/F_m v rozsáhlém souboru 190 genotypů pěstovaných v tuniské polopoušti. Nádobové pokusy simulující stres suchem u 18 genotypů pšenice pěstovaných v Etiopii neodhalily žádnou významnou korelaci mezi fluorescenčními parametry F_0 , F_m , F_v či F_v/F_m a výnosem zrna při nedostatku vody (Bogale *et al.* 2011). Další rozsáhlá analýza byla provedena u 142 rekombinantních inbredních linií (RIL) pěstovaných opět v suchých polních podmínkách Íránu; autoři této studie hodnotili nejen F_0 , F_m , F_v či F_v/F_m , ale i parametry NPQ, q_P a PI_{ABS} a domnívají se, že všechny tyto parametry je možné využít

jako sekundární selekční znaky při šlechtění pšenice na odolnost k suchu (Roostaei *et al.* 2011). Také Farshadfar *et al.* (2013) doporučují F_v/F_m pro hodnocení odolnosti pšenice k suchu; tito autoři pracovali s 20 krajovými odrůdami pšenice opět pěstovanými v polním prostředí íránských polopouští. Další íránská studie sledovala F_v/F_m u 14 genotypů pšenice, ale nenalezla žádné změny v tomto parametru v důsledku sucha, takže jej jako selekční znak nedoporučuje (Khamssi *et al.* Najaphy 2012).

Guo *et al.* (2008) nedestruktivně měřili některé parametry fluorescence Chl v listech 194 RIL ječmene a jejich dvou rodičovských genotypů, pěstovaných v nádobových pokusech simulujících stres suchem ve skleníku. Zároveň u nich mapovali QTL související s odolností k suchu v období po kvetení, a domnívají se, že fluorescenční parametry F_0 , F_m , F_v či F_v/F_m by mohly případně sloužit jako fenotypové markery při selekci na tuto vlastnost. Oukarroum *et al.* (2007) u 10 genotypů ječmene (nádobové pokusy, růstová komora, simulace sucha) provedli OJIP analýzu fluorescence Chl a kromě toho, že doporučují PI_{ABS} a z něho odvozený parametr DFI („drought factor index“, počítaný jako součet $\log PI_{ABS}$ po 1 týdnu sucha a $2 \times \log PI_{ABS}$ po dvou týdnech simulace sucha) pro rozlišení genotypů citlivých a odolných k tomuto stresoru, dokázali, že i změny v tzv. K a L pásech viditelných na OJIP křivkách diferenční kinetiky mohou sloužit u tohoto rostlinného druhu k podobnému účelu. Co se týče dalších jednoděložných rostlin, Selmani *et al.* Wassom (1993) studovali 11 různých linií kukuřice v suchých polních podmínkách Mexika a měřili u nich parametr F_v , který také doporučují jako vhodné kritérium pro selekci na odolnost k suchu. U čiroku (panel 300 genotypů, polní pokusy, Kansas, USA) nebyl parametr F_v/F_m tak dobrým měřítkem odolnosti jako např. CT (Mutava *et al.* 2011). Studie 23 různých hybridů kostřavy rákosovité, u nichž bylo sucho simulováno v nádobových pokusech ve skleníku nebo pomocí hydroponického pěstování a přidáním manitolu, ukázala, že parametry fluorescence Chl (F_v/F_m , F'_v/F'_m , Φ_{PSII} , NPQ) by mohly být dobrými charakteristikami pro selekci genotypů s vysokou odolností k nedostatku vody (Koscielniak *et al.* 2006).

Také u hospodářsky významných druhů patřících mezi dvouděložné rostliny bylo provedeno několik analýz fluorescence Chl u větších genotypových souborů v podmínkách vodního deficitu. Longenberger *et al.* (2009) hodnotili 20 genotypů bavlníku, pěstovaných bez zalévání v polním prostředí Texasu (USA), ale parametr F'_v/F'_m se jim pro rozeznávání citlivých a odolných genotypů neosvědčil. Ani u řepky nebyl poměr F_v/F_m vhodným ukazatelem odolnosti k suchu (soubor 14 genotypů, polní prostředí Íránu; Norouzi *et al.* 2008), a stejný výsledek poskytla analýza 16 různých genotypů bramboru testovaných v suchých pouštních podmínkách Peru (Schafleitner *et al.* 2007). V případě sezamu byla OJIP analýza použita pro hodnocení 24 genotypů pěstovaných v květináčích ve skleníkovém prostředí s omezenou dostupností vody a podobně jako u výše zmíněného ječmene i zde byly indexy PI_{ABS} a DFI velmi citlivými ukazateli odolnosti rostlin k suchu (Boureima *et al.* 2012). U rajčete parametry NPQ, Φ_{PSII} a ETR celkem dobře korelovaly s odolností k suchu; sucho zde bylo simulováno přidáním PEG k hydroponicky pěstovaným rostlinám 10 genotypů *S. lycopersicum* a čtyř dalších planých druhů rajčete (Shamim *et al.* 2013). Naproti tomu u vinné révy tyto tři parametry ani F_v/F_m neumožnily dobře rozlišit kultivary odolné a citlivé k nedostatku vody (testováno bylo 22 kultivarů pěstovaných v suchém polním prostředí Španělska) (Bota *et al.* 2001). U 24 kultivarů olivovníku (nádobové pokusy, skleníkové prostředí, jeden měsíc bez zalévání) hodnoty parametru F_v/F_m u stresovaných rostlin dobře odrážely odolnost jednotlivých genotypů (Faraloni *et al.* 2011).

Na základě uvedeného přehledu se zdá, že parametry fluorescence Chl by se u většiny rostlinných druhů zřejmě opravdu daly použít jako vhodná měřítka vnitrodruhové variability související s odolností rostlin k suchu. Některé práce korelaci mezi těmito charakteristikami a výnosem v podmínkách nedostatku vody sice nenalezly; to může být způsobeno volbou hodnoceného parametru (většinou šlo o nejjednodušší poměry F_v/F_m nebo F'_v/F'_m), rostlinným druhem nebo způsobem simulace sucha. Snadnost, rychlost, nedestruktivní charakter a finanční nenáročnost fluorescenčních měření tento typ analýz přímo předurčuje pro širší použití buď při přímé selekci odolných genotypů postupy klasického šlechtění, nebo pro fenotypizaci v rámci molekulárního šlechtění (Morison *et al.* 2008, Munns *et al.* 2010, Furbank *et al.* Tester 2011, Brestic *et al.* Zivcak 2013).

2.1.3. Molekulární šlechtění na odolnost k suchu

V posledních desetiletích se v souvislosti se šlechtěním na odolnost k nedostatku vody stále častěji hovoří o tzv. molekulárním šlechtění. Jedná se v podstatě o tři hlavní přístupy. První z nich se spokojuje s identifikací různých typů molekulárních markerů, jejichž konkrétní alely vykazují dobrou korelaci s vnějšími projevy odolnosti k suchu (různými morfologickými, fyziologickými i biochemickými charakteristikami). Tyto DNA markery pak využívá k zrychlení klasického

šlechtitelského procesu. Druhý přístup (často přímo spojený s prvním) mapuje pomocí identifikovaných DNA markerů QTL podmiňující odolnost k tomuto stresovému faktoru (odolnost k suchu, resp. výnos v podmínkách sucha, je kvantitativní znak podmíněný velkým počtem genů, proto se mapují QTL, nikoli jednotlivé konkrétní geny) a za použití různých metod QTL klonování se snaží identifikovat kandidátní geny související s touto vlastností. A konečně třetí přístup prostřednictvím genetických manipulací (zvyšování/snižování exprese určitých genů, vnášení nových genů) vytváří transgenní rostliny, které by měly být na nedostatek vody lépe přizpůsobeny (Tuberosa *et al.* 2006, Shanker *et al.* 2014).

Princip vyhledávání DNA markerů a QTL souvisejících s odolností k suchu je poměrně jednoduchý, musí být ale splněno několik podmínek (Semagn *et al.* 2010). Za prvé musí být k dispozici vhodná mapovací populace, která by měla být jak geneticky, tak fenotypově heterogenní, a navíc dostatečně polymorfní pro používané molekulární markery (zároveň musí u příslušného rostlinného druhu existovat dobře vysycená markerová mapa). Mapovací populace se připravují buď uměle, kdy na počátku stojí dva fenotypově kontrastní rodiče (např. odolný vs. citlivý k suchu) a několika generacemi křížení určitého typu se připraví soubory F2 nebo lépe F3 rodin, RIL, téměř izogenních linií (NIL), linií vzniklých zdvojením haploidů (DHL) apod., které pak mohou být využity k mapování QTL na základě vazby mezi konkrétní alelou DNA markeru a konkrétní alelou QTL. Tento typ mapování QTL se označuje jako „linkage-based QTL mapping“. Je také možné při mapování QTL využít přirozeně se vyskytující vazbovou nerovnováhu v přírodních (nebo i umělých) populacích při tzv. „linkage disequilibrium-based association QTL mapping“ (Semagn *et al.* 2010, Mir *et al.* 2012).

Druhou podmínkou, která musí být při mapování QTL splněna, je možnost snadné genotypizace jednotlivých členů mapovací populace, tj. jejich charakterizace z hlediska genotypu mnoha různých DNA markerů. To v dnešní době obvykle není problém, protože již bylo vyvinuto mnoho různých technik umožňujících práci s DNA ve velkém měřítku a s dostatečnou přesností. Zejména s rozvojem sekvenovacích technologií druhé a třetí generace lze velmi rychle a velmi snadno (a také relativně lacino) určit konkrétní alely nejrozličnějších DNA markerů u mnoha členů mapovacích populací (Cominelli *et al.* 2013).

Třetím předpokladem mapování QTL je možnost stejně snadno a ve stejně velkém rozsahu jako genotypizaci provést tzv. fenotypizaci dané mapovací populace, tj. charakterizovat její členy z hlediska znaků souvisejících s odolností k suchu. Jak je zřejmé z předchozích kapitol, takových znaků je mnoho, ale ne všechny jsou dobře využitelné pro testování velkých souborů (a navíc jejich projev často závisí na síle stresu, vývojovém stádiu rostliny nebo kombinaci s dalšími vnějšími i vnitřními vlivy). Fenotypizační možnosti a problémy s tím spojené jsou v současné době asi hlavním faktorem, který tento typ molekulárního šlechtění omezuje (Mir *et al.* 2012, Tuberosa 2012, Cominelli *et al.* 2013).

Pokud je všem výše uvedeným podmínkám vyhověno, lze DNA marker/QTL související s odolností k suchu identifikovat na základě statisticky prokázaného vztahu mezi určitými fenotypy (odolnost vs. citlivost k suchu založená na vysokých/nízkých hodnotách některé z charakteristik používaných pro fenotypizaci) a určitými genotypy (konkrétními alelami DNA markerů nebo QTL) (Semagn *et al.* 2010). Poté je nutno provést tzv. validaci, tj. potvrdit, že příslušný genotyp markeru/QTL skutečně souvisí s odolností k suchu nejen v mapovací populaci, ale i v dalších, geneticky odlišných populacích, a že jeho platnost není omezena pouze na konkrétní experimentální podmínky, ve kterých bylo mapování prováděno (Tuberosa *et al.* 2006, Mir *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014). Problémem při identifikaci QTL pro odolnost k suchu je nejen jejich velký počet, ale i to, že se zdá, že většina QTL podmiňujících tuto vlastnost má pouze minoritní účinek, který se navíc s různým genetickým pozadím může díky neaditivním mezialelickým interakcím měnit (Ribaut *et al.* 2002, Campos *et al.* 2004, Parry *et al.* 2005, Tuberosa *et al.* 2002, 2007, Reynolds *et al.* 2008, Xu *et al.* 2008, Kulwal *et al.* 2011). Publikací, které každoročně oznamují identifikaci QTL souvisejících s odolností k nedostatku vody je celá řada, s validací se bohužel obtěžuje již méně autorů, takže je otázka, do jaké míry mohou takové práce být ve skutečnosti prakticky použitelné (Tuberosa *et al.* 2006, Mir *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014).

Jakmile je QTL (nebo DNA marker) související s odolností k suchu jednou identifikován a validován, teoreticky nic nebrání tomu, aby šlechtitel mohl místo zdlouhavého a pracného sledování výnosu či produkce biomasy (případně dalších morfologických či fyziologických parametrů) za stresových a kontrolních podmínek testovat svůj šlechtitelský materiál pouze na přítomnost/nepřítomnost „výhodné“ alely a podle toho vybírat rostliny, které použije v dalším

šlechtění. Tento proces se označuje jako selekce za pomoci markerů (MAS, „marker-assisted selection“) a je nejjednodušší možností molekulárního šlechtění. Je také možné využít tzv. zpětné křížení za pomoci markerů (MABC, „marker-assisted backcrossing“), kdy se určitý genotyp QTL spojený s dobrou odolností k suchu vnáší opakovanými generacemi zpětného křížení do rodičovské linie/kultivaru, která vykazuje vysoký výnos v optimálních podmínkách, ale obvykle je méně odolná k suchu. Další možností je tzv. rekurentní selekce za pomoci markerů (MARS, „marker-assisted recurrent selection“), někdy také označovaná obecněji jako „QTL pyramiding“, která využívá vzájemného křížení vybraných jedinců v několika cyklech selekce, a umožňuje tak ve výsledných produktech takového křížení hromadit „výhodné“ alely různých QTL včetně minoritních. V tom má tento postup výhodu oproti MABC, které se většinou zaměřuje pouze na jeden majoritní QTL. Relativně novým přístupem molekulárního šlechtění je tzv. genomická selekce (GWS, „genome-wide selection“), kdy se nevyhledávají konkrétní alely DNA markerů spojených se znakem, na který se šlechtí, ale jedinci jsou hodnoceni na základě jakési komplexní šlechtitelské hodnoty založené na celém jejich genomu (GEBV, „genomic estimated breeding value“) (Tuberosa *et al.* 2006, Ashraf *et al.* 2009, Kulwal *et al.* 2011, Varshney *et al.* 2011, 2012, Cabrera-Bosquet *et al.* 2012, Mir *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014). Všechny uvedené postupy již byly ve šlechtění na odolnost k suchu u různých rostlinných druhů aplikovány a v některých případech bylo jejich prostřednictvím dosaženo praktických úspěchů. V případě MABC se jedná např. o rýži (introgrese QTL spojeného s parametry kořenů) a kukuřici (introgrese QTL spojených s ASI), u MARS byly různé QTL související s odolností k suchu nahromaděny při šlechtění pšenice, kukuřice, čiroku, cizrny, vigny, slunečnice nebo bavlníku (Tuberosa *et al.* 2006, Ashraf 2010, Mir *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014).

Hledání kandidátních genů spojených s odolností k suchu může být založeno na pozičním klonování, asociačním mapování, nebo spojení QTL map s tzv. funkčními mapami, tj. anotovanými genomovými sekvencemi, kde je u jednotlivých lokusů známá nebo předpokládaná funkce jejich produktů. Bouřlivě se rozvíjející technologie tzv. funkční genomiky dnes umožňují odhadovat funkci genových produktů v měřítku celého genomu. Tyto technologie pomáhají na základě rozdílné exprese (na úrovni transkriptomu či proteomu), případně dalších funkčních rozdílů (např. na úrovni posttranslačních modifikací proteinů, interakcí mezi proteiny nebo mezi proteiny a DNA elementy, modifikací struktury chromatinu apod.) mezi rostlinami vystavenými suchu a pěstovanými v optimálních podmínkách, nebo mezi kultivary citlivými a odolnými k suchu, identifikovat kandidátní geny, u nichž se předpokládá souvislost s odezvou na tento stresový faktor (Tuberosa *et al.* 2006, Tuberosa *et al.* 2007, Mir *et al.* 2012).

Kandidátní geny pro odolnost k suchu lze rozdělit do dvou hlavních kategorií. Jednak to jsou geny, jejichž produkty se přímo účastní ochrany rostlinných buněk před negativními důsledky sucha (sem patří např. geny kódující antioxidantní enzymy, geny pro enzymy katalyzující syntézu osmoprotektantů či dalších látek zneškodňujících ROS, dehydriny, sHSP a jiné chaperony, akvaporiny apod.). Za druhé jde o geny, jejichž produkty působí v regulačních a signalizačních drahách souvisejících s odpovědí rostlinné buňky na suchu (sem patří geny kódující transkripční faktory, Ca^{2+} -vazebné proteiny, kinázy a jiné signalizační proteiny, iontové kanály, senzorové proteiny, proteázy a jejich inhibitory apod.) (Deikman *et al.* 2012, Cabello *et al.* 2014). Manipulací jejich exprese pomocí transgenóze již byla připravena řada geneticky modifikovaných rostlin, které v laboratorních (a v některých případech i v polních) podmínkách vykazují zvýšenou odolnost k suchu. Většina těchto studií je bohužel prováděna na modelových rostlinách huseníčku Thalovu (*Arabidopsis thaliana* L.) a tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), ale během posledních deseti let se množí genetické manipulace s odolností k suchu i u hospodářsky významných druhů rostlin, jako je rýže, pšenice, kukuřice, řepka, sója, bavlník nebo rajče (Deikman *et al.* 2012).

Příkladem transgenních plodin, do nichž byly vneseny geny zvyšující produkci osmoprotektantů, může být např. kukuřice transformovaná genem pro cholindehydrogenázu, která vykazovala zvýšený obsah glycinbetainu a byla odolnější k suchu než netransformovaná kontrola (Quan *et al.* 2004). Transgenní rostliny pšenice, rýže nebo sóji (*Glycine max* (L.) Merrill) s nadprodukcí prolinu díky vnesenému genu pro 1-pyrrolin-5-karboxylátsyntázu nebo 1-pyrrolin-5-karboxylátreduktázu byly také odolnější vůči tomuto stresovému faktoru (De Ronde *et al.* 2004, Umezava *et al.* 2006, Vendruscolo *et al.* 2007, Hu *et al.* 2014). Podobná situace byla i u pšenice transformované genem pro jeden z enzymů biosyntézy manitolu (Abebe *et al.* 2003). Rýže transformovaná chimérickým genem pro trehalóza-6-fosfátsyntázu, který byl spojen s promotorem umožňujícím indukovat expresi pouze v podmínkách stresu, produkovala zvýšené množství trehalózy a byla odolnější k suchu než normální rostliny (Wu *et al.* 2003). Něco podobného bylo

zaznamenáno i u rajčete transformovaného stejným genem (Cortina *et al.* 2005). Také geny pro antioxidantní enzymy jsou v experimentech snažících se o zlepšení odolnosti k suchu pomocí genových manipulací do rostlin vnášeny a i zde byly pozorovány pozitivní efekty, např. u genu pro SOD vneseného do tolice vojtěšky (*Medicago sativa* L.), bramboru nebo rýže (Ashraf 2010). Zvýšená exprese genu kódujícího arginindekarboxylázu u rýže vedla k akumulaci polyaminů a lepší odolnosti k nedostatku vody (Capell *et al.* 2004). Vnesení jednoho z LEA proteinů (HVA1) do rýže, pšenice nebo moruše (*Morus indica* L.) mělo za následek snížení negativního účinku sucha na tyto rostliny (Umezawa *et al.* 2006, Ashraf 2010, Hussain *et al.* 2011). Transgenní rostliny rýže, do nichž byl vnesen gen pro jeden sHSP, sice nevykazovaly lepší odolnost k nedostatku vody jako takovému, ale na rozdíl od kontrolních rostlin se byly schopny po skončení období sucha vzpamatovat z negativních důsledků tohoto stresového faktoru (Sato *et al.* 2008). Rovněž manipulace exprese genů pro akvaporiny vedla v některých případech k lepší odolnosti k vodnímu deficitu např. u rýže, rajčete nebo sóji, zatímco u vinné révy měla naopak za následek větší citlivost k tomuto stresoru (Hussain *et al.* 2011, Martinez-Ballesta *et al.* 2014).

Již dlouho je známo, že stres suchem indukuje expresi mnoha specifických transkripčních faktorů a tyto proteiny jsou hlavními spouštěči a přepínači souběžné exprese velkého množství nejrozličnějších genů, které se v komplexním, dosud stále nepříliš prozkoumaném systému podílejí na vzniku stresového fenotypu. Regulace množství/aktivity těchto transkripčních faktorů je další možností, jak dosáhnout lepší odolnosti na podmínky vodního deficitu (Golldack *et al.* 2011) a v souvislosti s molekulárním šlechtěním a přípravou transgenních rostlin odolných k suchu se o ní hodně uvažuje. Transkripční faktory účastníci se odezvy na suchu patří většinou do několika hlavních rodin: DREB/CBP proteiny, bZIP/AREB proteiny, NAC proteiny, WRKY proteiny, MYB/MYC proteiny, proteiny tzv. „zinkových prstů“ a některé další. Některé z nich fungují v regulačních drahách souvisejících se signalizací pomocí ABA, jiné účinkují nezávisle na ABA (Ramanjulu *et al.* 2002, Yamaguchi-Shinozaki *et al.* 2005, Umezawa *et al.* 2006, Valliyodan *et al.* 2006, Shinozaki *et al.* 2007, Farooq *et al.* 2009, Yang *et al.* 2010b, Yoshida *et al.* 2010, Golldack *et al.* 2011, Deikman *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014). I v tomto případě je již známa řada transgenních plodin s upravenou expresí genů pro tyto transkripční faktory, které vykazují lepší odolnost k suchu; jedná se především o rýži, dále o pšenici, případně kukuřici, vojtěšku, podzemnici olejnou, rajče nebo brambor (Umezawa *et al.* 2006, Yang *et al.* 2010b, Hu *et al.* 2014).

Signalizační proteiny typu kináz, Ca²⁺-vazebných proteinů nebo proteinů účastnících se lipidové signalizace jsou také testovány jako jedna z možností, jak pomocí transgenózy vylepšit odolnost rostlin k nedostatku vody. I v tomto případě již bylo dosaženo některých úspěchů např. u rýže, kukuřice či bavlníku (Umezawa *et al.* 2006, Yang *et al.* 2010b, Hu *et al.* 2014). Především na rýži je v souvislosti s odolností k suchu zatím testována úprava množství některých proteáz a označování proteinů ubiquitinem jako signálem pro degradaci (Deikman *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014). U rýže i řepky byly prováděny rovněž pokusy s manipulací farnesylace jako další posttranslační modifikace cílových proteinů (Umezawa *et al.* 2006, Yang *et al.* 2010b, Deikman *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014). Jinou možností genetické manipulace, která by potenciálně mohla vést ke zlepšení reakce rostlin na vodní deficit, je ovlivnění syntézy/degradace ABA, případně dalších hormonů hrajících roli v odezvě rostlin na tento stresový faktor (práce na rýži, bavlníku, sóji; Deikman *et al.* 2012, Hu *et al.* 2014).

Expresí mnoha různých genů podílejících se na odezvě rostlin na nedostatek vody může být specificky nebo nespecificky regulována i epigeneticky na úrovni modifikací struktury chromatinu spojených s úpravami histonů, záměnou různých histonových variant, metylací DNA či prostřednictvím malých regulačních RNA. V poslední době prací na toto téma přibývá (Shanker *et al.* 2014). Stres suchem indukuje např. expresi specifických variant spojovacího histonu H1 (H1-S), což zřejmě hraje roli v regulaci uzavírání průduchů (Scippa *et al.* 2004, Trivedi *et al.* 2012). Expresí různých genů indukovaných suchem může také být asociovaná s epigenetickými modifikacemi histonů H3 a H4 – změnou jejich acetylace, metylace a fosforylace na specifických aminokyselinách (Sokol *et al.* 2007, Kim *et al.* 2008, van Dijk *et al.* 2010). ABA, jejíž syntéza je suchem zvýšena, reguluje expresi histondeacetyláz a prokázalo se, že tato regulace souvisí s odolností k stresu zasolením a k suchu (Sridha *et al.* 2006). Také DNA metylace/demethylace je jednou z možností regulace genové exprese, která se uplatňuje v odpovědi rostlin na suchu (Wang *et al.* 2011). Totéž platí pro některé miRNA, které regulují expresi genů specifických pro odezvu rostlin na vodní deficit (Ren *et al.* 2012, Sunkar *et al.* 2012, Ding *et al.* 2013). U sóji byla např. přímo prokázána souvislost mezi sníženou produkcí některých miRNA a odolností k suchu (Kulcheski *et al.* 2011). Také siRNA

mohou zřejmě hrát důležitou úlohu v regulaci buněčné odpovědi na nedostatek vody (Khraiweh *et al.* 2012). Tato problematika se v současné době značně rozvíjí a lze očekávat mnoho nových poznatků, které by mohly být prakticky aplikovatelné v různých transgenních přístupech pro získání rostlin s lepší odolností k suchu (Cabello *et al.* 2014).

I přes výše uvedené pokroky není zatím využití postupů molekulární biologie ve šlechtění rostlin na odolnost k suchu tak velkým přínosem, jak se původně očekávalo. Roli v tom nepochybně sehrává nejen celková složitost procesů, které jsou s tímto znakem u rostlin spojeny, ale i nejrůznější faktory související s ekonomickou výhodností těchto postupů oproti postupům klasického šlechtění. Vždy je nutné důkladně propočítat, jak velký finanční přínos lze očekávat při inkorporaci některé z metod molekulárního šlechtění do šlechtitelských programů vzhledem k nákladům na pořízení a provoz nezbytných přístrojů a zařízení, nákladům na provádění molekulárního testování, nákladům na vyškolení pracovníků, kteří by tyto testy mohli rutinně provádět, nákladům spojeným s licenčními poplatky a autorskými právy atd. (Brennan *et al.* 2007). U transgenních plodin je nutné také zvážit vstřícnost (či zejména v Evropě spíše neochotu), s jakou je přijímá veřejnost. V každém případě však využití různých moderních metod a technik molekulární biologie významně rozšiřuje naše poznatky o reakci rostlin na nedostatek vody a o podstatě citlivosti/odolnosti k tomuto stresovému faktoru. Už jen z tohoto důvodu jistě stojí za to se touto problematikou zabývat v rámci jak základního, tak aplikovaného výzkumu.

2.2. Proteomické analýzy u rostlin vystavených suchu

Starší (ale i současné) studie zaměřené na odolnost rostlin k různým stresovým faktorům se zajímaly především o morfologické, fyziologické, případně biochemické projevy spojené s účinkem příslušného stresového faktoru a se stresovou tolerancí. Bouřlivý rozvoj molekulárně-biologických technologií na konci dvacátého a začátku jednadvacátého století, zejména různé „omické“ přístupy, však vědcům umožnily celkový pohled na změny v genové expresi (Bohnert *et al.* 2006). Tyto práce odhalily mnoho různých skupin genů/proteinů, které hrají důležitou roli v reakci rostlin na stres a které mohou souviset s odolností vůči stresovým faktorům. Nejjednodušší studie tohoto typu jsou zaměřeny pouze na kvalitativní a kvantitativní změny genové exprese indukované na úrovni transkripce, resp. množství RNA. Různé studie transkriptomu nepochybně umožnily první rozsáhlejší analýzy změn vyvolaných suchem a odhalily mnoho různých genů, které jsou během odezvy na dehydrataci regulovány odlišně (např. Seki *et al.* 2002, 2007, Zheng *et al.* 2004, 2010, Shinozaki *et al.* Yamaguchi-Shinozaki 2007, Torres *et al.* 2007, Abdeen *et al.* 2010, Lenka *et al.* 2010, Moumeni *et al.* 2011, Kido *et al.* 2012, Li *et al.* 2012, Utsumi *et al.* 2012, Rasmussen *et al.* 2013, Gross *et al.* 2013).

Molekulární analýza zaměřená na stresovou reakci rostlin však nemůže být zaměřená pouze na úroveň transkriptomu. Změny odehrávající se v rostlinné buňce během vodního stresu závisejí na interakcích a modifikacích velkého počtu proteinů, které se podílejí na různých metabolických, signálních, biosyntetických a degradačních drahách a jiných buněčných pochodech. Množství a funkce těchto proteinů jsou regulovány nejen syntézou/degradací příslušných mRNA, ale také na translační a postranlační úrovni. U rostlin stresovaných suchem byly nalezeny různé nesrovnalosti mezi množstvím transkriptů a množstvím příslušných proteinů (Kottapali *et al.* 2009, Peng *et al.* 2009). Je zřejmé, že pro identifikaci konkrétních proteinů, které by mohly souviset s odolností k suchu, transkriptomické analýzy nestačí. Analýzy proteomu lépe odrážejí situaci a nabízejí různé výhody, díky nimž lze studovat široké rozpětí molekulárních změn spojených s reakcí na stres.

Jak je v biologii bohužel obvyklé, výzkum věnující se proteomickým analýzám u rostlin poněkud zaostává za obdobným výzkumem prováděným u prokaryot, kvasinek či živočichů. Po nesmělých začátcích se však i tato problematika v poslední době poměrně intenzivně rozvíjí a různé metody a techniky, původně vyvinuté pro jiné organizmy, jsou nyní úspěšně využívány i u rostlin. V prvopočátcích se proteomické analýzy prováděné u stresovaných rostlin spokojovaly s pouhou detekcí kvalitativních změn proteinového spektra, ale velmi rychle začaly být používány různé metody umožňující relativní nebo absolutní kvantifikaci proteinů. V současné době lze v rostlinné proteomice využít pro kvantifikaci změn ve složení proteomu široké spektrum metod. Metody založené na využití protilátek (např. ELISA a Western blotting) jsou používány ke kvantifikaci specifických proteinů již mnoho let. Takové metody jsou ovšem zaměřeny již na jeden nebo několik konkrétních proteinů, pro které musejí být k dispozici protilátka, a je tedy nutné protein, jehož se analýza týká, znát předem. Jiné metody jsou pro celkovou kvantifikaci proteinů ve velkém měřítku mnohem vhodnější. Lze použít

buď přístupy založené na separaci proteinů pomocí gelové elektroforézy („gel-based methods“) nebo přístupy nezávislé na gelové elektroforéze („gel-free methods“) (Binschedler *et al.* 2011).

V případě gelových metod je nejjednodušší možností separace proteinů jednorozměrná gelová elektroforéza („1-dimensional gel electrophoresis“, 1-DGE), která rozděluje proteiny ve vzorku podle velikosti. Dvourozměrná gelová elektroforéza („2-dimensional gel electrophoresis“, 2-DGE) dělí proteiny podle jejich izoelektrického bodu a podle velikosti. U gelů se pak hodnotí poměry intenzit skvrn, což však může být ovlivněno chybou vycházející z technické variability mezi gely. Tradičně jsou tyto gely pro porovnání barveny obecnými barvivými proteinů, tj. stříbrem nebo koloidní Coomassie Blue, případně fluorescenčními barvivými. Nesrovnalosti vedoucí k chybám při porovnání vzorků rozdělených na různých gelech jsou minimalizovány pomocí DIGE („difference in gel electrophoresis“) metody. U DIGE jsou použita fluorescenční barviva jako např. CyDyesTM, která umožňují označit různou fluorescenční značkou dva proteinové vzorky, které jsou smíchány ještě před nanesením na gel. Referenční standard obsahující shodné množství obou vzorků je označen třetím barvivem a je používán pro vylepšení kvantitativního odečítání metody. Při DIGE analýze jsou poměry množství jednotlivých proteinů ve vzorcích počítány ze změřené fluorescence každé skvrny, a tak jsou také získána kvantitativní data pro jednotlivé izoformy proteinů. Touto metodou lze kvantifikovat i proteiny, které mají stejnou sekvenci, ale jiné post-translační modifikace. 2-DGE a DIGE přístupy jsou méně vhodné pro komplexní a rozsáhlé proteomické studie, neboť pro další identifikaci proteinů hmotnostní spektrometrií („mass spectrometry“, MS) jsou obvykle z finančních i časových důvodů vybírány pouze proteiny s výraznějšími změnami. Navíc gelové skvrny mohou být tvořeny více než jedním proteinem nebo více izoformami, tudíž je často nemožné přiřadit správnou kvantitativní hodnotu k relevantní identifikaci proteinu. Vylepšení DIGE se očekává v oblasti vývoje nových barviv, např. pro specifické barvení při identifikaci posttranslačních modifikací, nebo obecně v pokroku v oblasti 2-DGE (Binschedler *et al.* 2011).

Metody nezávislé na gelové separaci se často nazývají tzv. „shotgun“ přístupy, kde je k separaci používána zejména kapalinová chromatografie („liquid chromatography“, LC, resp. HPLC), na kterou je navázána MS analýza. LC může také předcházet rozdělení proteinů pomocí 1-DGE. Tyto metody lze dále rozdělit na metody používající značení proteinů („tzv. label-based methods“) a na metody bez značení (tzv. „label-free methods“). MS signály bývají často variabilní a nepředvídatelné např. z důvodu konkurence při ionizaci ve složitých vzorcích, nehomogenity vzorků a nedostatků vzniklých při zacházení se vzorkem. V kvantitativních proteomických studiích mohou být tyto vlivy potenciálním zdrojem poměrně velkých chyb, zejména pokud jsou MS signály porovnávány mezi jednotlivými experimenty. Tak je tomu u metod bez značení, závislých na relativním porovnání MS iontových signálů. Tyto analýzy musí být pečlivě provedené, aby se zamezilo vlivu výše zmíněných vnitřních chyb (Binschedler *et al.* 2011).

Navzdory možným nepřesnostem se metody bez značení staly velmi populárními, protože nevyžadují nákladné značení proteinů a mohou se přizpůsobit jakémukoliv typu organismu a většině pokusných režimů (Schulze *et al.* 2010, Binschedler *et al.* 2011). Kvantifikace u těchto metod probíhá buď na základě tzv. intenzity iontů („ion intensities“), kdy se počítá s intenzitou (výškou, plochou) iontového píku z výsledku MS analýzy, nebo na základě tzv. počítání spekter („spectrum count“), kdy se počítá s frekvencí MS/MS skenů, které jsou přiřazeny jednomu proteinu. Frekvence těchto MS/MS skenů tak odráží hojnost příslušného peptidu ve vzorku (Thelen *et al.* 2007, Oeljeklaus *et al.* 2009, Schulze *et al.* 2010, Binschedler *et al.* 2011). Další metody relativní kvantifikace nevyužívající značení (např. LC/MS^E, emPAI – „exponentially modified protein abundance index“, APEX – „absolute protein expression“ nebo PCP – „protein correlation profiling“) nejsou zatím v rostlinné proteomice příliš využívány (Baginsky 2009, Schulze *et al.* 2010, Binschedler *et al.* 2011, Remmerie *et al.* 2011).

Snaha odstranit rozdílnost mezi jednotlivými měřeními byla základem pro vývoj značících strategií umožňujících porovnání piků v rámci jednoho MS nebo MS/MS skenu (Thelen *et al.* 2007). Různé značící techniky používané pro srovnání vzorků snižují množství potřebných technických opakování. „Shotgun“ přístupy se značením peptidů/proteinů ve vzorcích, které jsou analyzovány současně, využívají ke značení stabilní izotopy např. ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N, ¹⁸O/¹⁶O, ²H/¹H. Pak je možné podle různých molekulových hmotností jednotlivé vzorky od sebe odlišit v MS (Han *et al.* 2008, Schulze *et al.* 2010).

Příkladem tzv. metabolického značení proteinů izotopy *in vivo* je metoda SILAC („stable isotope labeling by amino acids in cell cultures“), během níž dochází k označení proteinů inkorporací izotopově značených aminokyselin (hlavně argininu, případně leucinu, lyzinu) z růstového média (Schulze *et Usadel* 2010, Binschedler *et Cramer* 2011). Dále je známo metabolické značení pomocí inkorporace přímo izotopu ^{15}N z média obsahujícího jako zdroj dusíku anorganické soli (Thelen *et Peck* 2007, Oeljeklaus *et al.* 2009). Obě tyto metody tedy značí proteiny během jejich syntézy. Vyžadují ovšem práci s buněčnými kulturami, což poněkud omezuje jejich využitelnost (ne pro všechny rostlinné druhy lze buněčné kultury připravit a navíc děje v buněčných kulturách nemusejí odpovídat dějům v rostlině jako takové). Metody HILEP („hydroponic isotope labeling of entire plants“) a SILIP („stable isotope labeling *in planta*“), které využívají pěstování rostlin v hydroponických kulturách nebo na agarovém médiu, a u nichž je značení proteinů rovněž založeno na inkorporaci ^{15}N z anorganických solí, tento problém překonávají (Abreu *et al.* 2013). SMIRP („subtle modification of isotope ratio proteomic“) využívá pro značení médium s glukózou obsahující ^{13}C (Binschedler *et Cramer* 2011).

Značení proteinů probíhající až po jejich extrakci probíhá za pomoci kovalentního značení izotopovými značkami. Nejpopulárnější chemické značky dostupné na trhu typicky cílí na -SH skupinu cysteinu, jako je tomu v případě ICAT („isotope-coded affinity tags“), nebo na sekundární aminy, jako je tomu v případě TMT („tandem mass tags“), iTRAQ („isobaric tags for relative and absolute quantification“) a ICPL („isotope-coded protein labels“) značek (Binschedler *et Cramer* 2011). Je ale také možné značku přidat během trypsinového štěpení proteinu pro MS a to přidáním H_2^{18}O na místo štěpení (Schulze *et Usadel* 2010).

ICAT a ICPL značení obvykle probíhá na úrovni proteinů, je tak možné vzorky smíchat ještě před štěpením proteázou, a tak snížit variabilitu vznikající při manipulaci se vzorky. U TMT a iTRAQ značení probíhá až na úrovni peptidů. ICAT značka obsahuje tři části: reaktivní skupinu, která se specificky váže k cysteinovým zbytkům, izotopovou značku s těžkým nebo lehkým izotopem a biotin pro afinitu při purifikaci. Proteiny různých vzorků jsou značeny různými ICAT značkami (s izotopy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), smíchány a proteolyticky štěpeny. Označené peptidy obsahující cystein jsou purifikovány afinitní chromatografií za použití kolony obsahující avidin. Protože však mohou být analyzovány pouze peptidy obsahující cystein, má tato metoda svá omezení. iTRAQ and TMT jsou tzv. isobarické značky (tj. jimi značené peptidy mají původně stejnou molekulovou hmotnost a k rozlišení dojde až po jejich fragmentaci) a jsou primárně navrženy pro značení peptidů. Tyto značky mají mírně odlišnou molekulární strukturu, což vede k odlišitelným iontovým fragmentům při MS analýze. Protože jsou vzorky smíchány až po naštěpení proteinů, nemůže být před touto fází zamezeno variabilitě mezi vzorky a tedy i případné chybě při kvantifikaci. Stejně omezení nalezneme i u metody, kde probíhá značení pomocí $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ během trypsinového štěpení v prostředí H_2^{16}O , resp. H_2^{18}O (Schulze *et Usadel* 2010, Binschedler *et Cramer* 2011).

Dosud zmíněné metody jsou určeny pro stanovení relativního obsahu proteinů ve vzorku a jsou vhodné pro detekci rozdílně exprimovaných či modifikovaných proteinů. K přeměně relativních dat na absolutní je nutné zahrnout do analýzy interní standard o známé koncentraci, který musí být označen tak, aby byl odlišitelný od ostatních proteinů ve vzorku. Syntetické peptidy s „těžkou“ aminokyselinou na jedné či více pozicích jsou nazývány AQUA („absolute quantification“) peptidy a jsou používány pro absolutní kvantifikaci (Thelen *et Peck* 2007, Baginsky 2009, Schulze *et Usadel* 2010, Binschedler *et Cramer* 2011).

Přibližně před deseti lety se objevily také negelové přístupy založené na tzv. dvojrozměrné LC-MS analýze (2-D LC-MS), kdy se pro první dělení peptidů (podle náboje) používá např. SCX technika („strong cation exchange chromatography“) a pro dělení ve druhém rozměru (podle hydrofóbnosti) chromatografie na reverzní fázi („reverse phase“, RP), dále techniky HILIC („hydrophilic interaction liquid chromatography“), SEC („size-exclusion chromatography“), případně RP-RP HPLC, u níž se pro první a druhý rozměr dělení používá eluce z kolon s vysokým a nízkým pH (Agrawal *et al.* 2013, Petersen *et al.* 2013).

Jak u gelových, tak u negelových přístupů je pro vlastní identifikaci jednotlivých proteinů dnes nezbytná následující MS analýza (dříve se po rozdělení proteinů elektroforézou používalo většinou Edmanovo N-koncové sekvenování). Ačkoli existuje několik typů hmotnostních spektrometrů s rozdílnými technologiemi detekce a fragmentace peptidů, všechny pracují na podobném principu. Po naštěpení proteázou (nejčastěji se používá trypsin, štěpící polypeptidový řetězec na C-straně argininu a lyzinu) je směs peptidů rozdělena na chromatografu buď přímo spojeném s hmotnostním spektrometrem nebo před MS analýzou. Peptidy jsou ionizovány k získání

počáteční MS analýzy (MS skenu), tj. spektra poměrů hmotnost/náboj (m/z) ve vzorku. Vybrané peptidy z počátečního MS skenu jsou pak individuálně fragmentovány pro druhou MS analýzu k určení aminokyselinové sekvence (Thelen *et al.* 2007).

Podstatou MS je detekce nabitých částic (iontů), které vznikají z molekul vzorku při ionizaci. Hmotnostní spektrometry se skládají ze tří částí – iontového zdroje, iontového separátoru a detektoru. Ionizačních technik, jejichž cílem je vytvořit nabitou částici, která je následně analyzována, existuje celá řada. Lze rozlišit tzv. „tvrdé“ ionizační techniky, při nichž je vlivem přebytku dodané energie vzniklý ion dále štěpen, a „měkké“ ionizační techniky, při nichž dochází k malé nebo skoro žádné fragmentaci. Příkladem „tvrdé“ ionizace je elektronová ionizace („electron ionization“, EI), jejíž energie vytváří ion z neutrální molekuly a dále ion štěpí; je při ní nutná teplotní stálost sloučeniny a ionizace probíhá po zplynění (zahřátí) látky v prostředí vakua. V praxi se touto metodou tvoří pouze kladně nabitý ionty a není příliš vhodná pro biologické vzorky. Během „měkké“ ionizace stačí dodaná energie většinou pouze na vytvoření iontu z neutrální molekuly. Příkladem jsou ionizační techniky rutinně používané při LC-MS analýzách jako je ESI („electrospray ionization“), APCI („atmospheric pressure chemical ionization“) nebo MALDI („matrix-assisted laser desorption/ionization“). ESI je vhodná pro teplotně nestálé i vysokomolekulární sloučeniny, ionizace probíhá z roztoku sloučeniny a rozpouštědla (mobilní fáze), sloučeniny musí ale vykazovat určitou polaritu (např. mají kyslík nebo dusík v molekule). APCI se hodí pro teplotně stabilnější látky než ESI, ionizace probíhá z plynné fáze po odpaření roztoku sloučeniny a rozpouštědla (mobilní fáze). MALDI je ionizace vzorku v přítomnosti pevné matrice vzorku laserem a je vhodná pro vysokomolekulární, teplotně nestálé i nepolární sloučeniny (El-Aneel *et al.* 2009).

Také iontových separátorů existuje několik typů. Může to být např. lineární kvadrupol (Q), což jsou čtyři kovové tyče hyperbolického nebo kruhového průřezu, které jsou připojeny ke zdrojům konstantního a střídavého napětí. Ionty, které vletnou do prostoru mezi tyčemi, se dostanou do střídavého elektrického pole a začnou oscilovat. Dalším příkladem iontového separátoru je iontová past („ion trap“, IT), resp. kvadrupolová iontová past (QIT) nebo lineární iontová past (LIT, LTQ), kde jsou ionty účinkem elektrického pole uzavřeny v ohraničeném prostoru. Průletový analyzátor („time-of-flight“, TOF) je tvořen prázdnou trubicí a k časovému rozdělení iontů podle m/z dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru. V typu Orbitrap je svazek iontu v tzv. C-pasti zbrzděn kolizí s molekulami dusíku, stlačen a vystřelen do separátoru. Na jeho centrální elektrodě se postupně zvyšuje napětí, ionty se začínají spirálově pohybovat a generují proudový signál, který je pomocí Fourierovy transformace převeden na MS spektrum. Magnetický-sektorový hmotnostní analyzátor umožňuje prostorové rozdělení svazku iontu podle hodnoty m/z ; jedná se o elektromagnet, mezi jehož pólovými nástavci prochází usměrněný paprsek iontů z elektrického pole. Existují i hybridní přístroje, které jsou složeny z více typů iontových separátorů, např. Triple Quad (QQQ), Q-TOF, IT-Orbitrap nebo IT-TOF (Han *et al.* 2008, El-Aneel *et al.* 2009).

Mnoho hmotnostních spektrometrů používá také dva nebo více hmotnostních analyzátorů pro tandemovou hmotnostní spektrometrii (MS/MS). První ionizace a následná fragmentační reakce generuje ionty, z nichž se vybere požadovaný ion, ten se podrobí další fragmentační reakci a z něj vzniklé ionty se analyzují. Požadovaný ion (tzv. prekurzor) se podrobí tzv. kolizní disociaci („collision-induced dissociation“, CID) nejčastěji srážkami s kolizním plynem. Tím se tento ion rozpadá na fragmenty, jejichž hmotnostní spektrum se změní. MS/MS spektrum pak obsahuje fragmentové ionty pocházející pouze z prekurzoru (El-Aneel *et al.* 2009).

Při analýze proteinů MS mohou být proteiny identifikovány v zásadě dvěma přístupy – na základě tzv. PMF („peptide mass fingerprinting“) a PFS („peptide fragment sequencing“). Při PMF je protein (buď v roztoku, nebo v gelu) štěpen proteázou na jednotlivé peptidy. Směs peptidů je analyzována pomocí MS. Výsledkem je hmotnostní spektrum směsi peptidů. Počet a velikost peptidů je následně porovnávána s databázemi již sekvenovaných proteinů. Výhody tohoto přístupu spočívají ve vysoké citlivosti MS pro malé molekuly, ve snadnosti, s jakou jsou peptidy získány štěpením a elucí např. z gelu ve srovnání s obtížnou elucí neštěpeného proteinu. Nevýhodou je, že se dá zjistit pouze relativní molekulová hmotnost proteinu a jednotlivých peptidů, a také, že musí jít o známé, již sekvenované proteiny. Metoda PFS umožňuje získat informaci o částečné sekvenci jakýchkoliv (tj. i dosud nesekvenovaných) proteinů. Proteiny jsou opět štěpeny proteázou na peptidy, které jsou obvykle podrobeny RP-LC, při které dojde k rozdělení peptidů na základě jejich pohyblivosti na koloně. Jednotlivé frakce se postupně dostávají do hmotnostního spektrometru, kde je v reálném čase vybrán jeden či více peptidů, který je dále fragmentován. Fragmenty jsou pak postupně vháněny na detektor podle poměru m/z . Výsledkem je soubor MS spekter peptidů a MS/MS spekter směsí

fragmentů. Velikosti jednotlivých fragmentů jsou porovnávány a z jejich rozdílů jsou zjištěny jednotlivé aminokyseliny (Han *et al.* 2008).

Výše uvedené metody byly uplatněny v nejrůznějších typech proteomických studií u mnoha rostlinných druhů. V souvislosti s působením různých abiotických stresových faktorů lze v posledních letech nalézt poměrně velké množství publikací, které se zabývají změnami ve složení rostlinného proteomu v důsledku stresu. Několik přehledových článků a kapitol v knihách, publikovaných v letech 2007-2014, výsledky těchto studií velmi pěkně shrnuje (Hashiguchi *et al.* 2007, Vincent *et al.* 2007, Qureshi *et al.* 2007, Timperio *et al.* 2008, Taylor *et al.* 2009, Kosová *et al.* 2011, Hakeem *et al.* 2012, Hossain *et al.* 2012, Abreu *et al.* 2013, Barkla *et al.* 2013, Komatsu *et al.* 2013, Vanderschuren *et al.* 2013, Rodziewicz *et al.* 2014). Všechny tyto přehledové články však vždy popisují více stresových faktorů, případně se soustřeďují na metodické aspekty proteomických analýz, a je logické, že nemohou být úplně vyčerpávající a pro každý stresový faktor zachytit úplně všechny studie, které se příslušné problematice věnují. Právě o takovéto shrnutí jsem se v případě proteomických analýz u rostlin stresovaných suchem pokusila v následující části tohoto přehledu.

2.2.1. Analýzy listového proteomu rostlin v souvislosti se stresem suchem

V **Tab. 1** je uveden stručný přehled prací, které se věnovaly změnám listového proteomu pod vlivem sucha (případně v kombinaci s jiným stresem či různým ošetřením rostlin). Zatímco v prvních šesti letech dvacátého století byly publikovány průměrně 1-2 takovéto studie ročně, v letech 2007 a 2008 se tento počet již zvýšil na 3-4 a od roku 2009 došlo k výraznému nárůstu článků na toto téma (9-13 za rok). Nepochybně k tomu přispělo vylepšení a snazší dostupnost různých technologií pro detekci, identifikaci a kvantifikaci proteinů a jejich posttranslačních modifikací. V naprosté většině proteomických studií, které se věnují reakci rostlin na stres suchem, byla pro rozdělení proteinů použita některá z metod gelové separace: klasická 2-DGE (52 prací uvedených v **Tab. 1**), DIGE (11 prací) nebo 1-DGE (3 práce). Negelové metody (iTRAQ, SILIP, metody bez značení proteinů) byly použity spíše výjimečně (5 prací). Typy hmotnostních spektrometrů využívaných pro identifikaci proteinů jsou již více diverzifikované, můžeme se setkat především s MALDI-TOF nebo MALDI-TOF/TOF (38 prací), ale také s ESI-IT (13 prací), ESI-QQQ-IT (2 práce), ESI-TOF (1 práce), ESI-Q-TOF nebo ESI-QQQ-TOF (5 prací), ESI-Orbitrap nebo ESI-Orbitrap v kombinaci s IT (4 práce) a především u starších publikací i s Edmanovým mikrosekvenováním (3 práce). V některých případech byla dělána i analýza pomocí imunoblotů (5 prací).

Poměrně velké množství proteomických analýz bylo realizováno na jednoděložných rostlinách, a to zejména zemědělsky významných druzích: rýži (9 prací), kukuřici (7 prací), různých druzích pšenice (6 prací), ječmenu (4 práce) či cukrové třtině (2 práce). Analyzovány byly i různé druhy trav (kostřava rákosovitá; lipnice luční – *Poa pratensis* L.; psineček výběžkatý – *Agrostis stolonifera* L.; troskut prstnatý – *Cynodon dactylon* (L.) Pers.; pýrovník – *Elymus elongatus* (Host) Runemark; *Sporobolus stapfianus* Gand; celkem 8 prací) a jedna práce (Vanhove *et al.* 2012) analyzovala křížence banánovníku (*Musa* sp.).

V rámci dvojděložných rostlin byly často studovány druhy patřící do čeledi *Fabaceae*, ať už šlo o cizrnu (Pandey *et al.* 2007), sóju (Mohammadi *et al.* 2012a), hrachor setý (Wu *et al.* 2011), podzemnici olejnou (Kottapalli *et al.* 2009), tolici setou/vojtěšku (Aranjuelo *et al.* 2011) či fazol (Zadrazil *et al.* 2013). Z dalších zemědělsky významných rostlin, u nichž byla analyzována reakce listového proteomu na suchu, je třeba zmínit bavlník (Parida *et al.* 2007, Deeba *et al.* 2012), vinnou révu (Vincent *et al.* 2007, Cramer *et al.* 2013), lubenici obecnou/meloun (*Citrullus lanatus* L., Akashi *et al.* 2011, Sanda *et al.* 2011) a slunečnici (Castillejo *et al.* 2008, Fulda *et al.* 2011). Jedna práce (Hajheidari *et al.* 2005) se zabývala řepou, další autoři pracovali s moruší (Guha *et al.* 2013) nebo rakytníkem řešetlákovitým (*Hippophae rhamnoides* L., Xu *et al.* 2009). Z dřevin bývají často analyzovány různé druhy či kříženci topolu (*Populus* sp.; celkem osm prací) nebo dubu (*Quercus ilex* L.; Echevarría-Zomeño *et al.* 2009, Valero-Galván *et al.* 2013; *Q. robur* L.; Sergeant *et al.* 2011), případně blahovičnick (*Eucalyptus* sp.; Bedon *et al.* 2012). Konečně mezi méně běžnými druhy, u nichž byla provedena analýza listového proteomu v souvislosti s nedostatkem vody, lze jmenovat např. laskavec červenoklasý (*Amaranthus hypochondriacus* L.) (Huerta-Ocampo *et al.* 2009), druh *Carissa spinarum* L. z čeledi *Apocynaceae* (Zhang *et al.* 2010a), případně vraneček *Selaginella tamariscina* (P. Beauv.) Spring. (Wang *et al.* 2010b). Překvapivě, u modelové rostliny huseníčku Thalova se mi podařilo najít pouze jedinou studii tohoto typu (Skirycz *et al.* 2011).

Tab. 1. Přehled prací zabývajících se analýzou listového proteomu u rostlin vystavených suchu. Vysvětlivky použitých zkratk jsou uvedeny na konci tabulky.

| Druh rostliny | Podmínky* | Metody** | Poznámka | Citace |
|-----------------------------------|--|--|---|---|
| <i>Zea mays</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 3 týdny SUCHO: 10 dnů P/OZ | 2-DGE; Edmanovo mikrosekvenování | srovnání inbredních rodičů a křížence | Riccardi <i>et al.</i> 1998 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 20 dnů SUCHO: 23 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI- TOF MS, ESI-Q- TOF MS/MS | kromě sucha i následná obnova; srovnání citlivého a odolného genotypu | Salekdeh <i>et al.</i> 2002 |
| <i>Zea mays</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 3 týdny SUCHO: 4, 6, 8, 10, 14 dnů P/OZ | 2-DGE; Edmanovo mikrosekvenování | různá délka sucha; srovnání genotypů (bez stanovení odolnosti) | Riccardi <i>et al.</i> 2004 |
| <i>Beta vulgaris</i> | PĚSTOVÁNÍ: pole STÁŘÍ: stádium 4. listu SUCHO: P/OZ až do sklízňe | 2-DGE; nano ESI- TOF MS/MS | srovnání genotypů (bez stanovení odolnosti) | Hajheidari <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Zea mays</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: stádium 5. listu/3 týdny SUCHO: 10 dnů/3, 4, 5 dnů P/OZ | 2-DGE; Edmanovo mikrosekvenování | různá délka sucha | Vincent <i>et al.</i> 2005 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 2 týdny SUCHO: 2 až 6 dnů P/OZ | 2-DGE; sekvenování N- koncových a vnitřních aminokyselin | kromě sucha i stres zasolením a následná obnova; srovnání citlivého a odolného genotypu | Ali <i>et al.</i> Komatsu 2006 |
| <i>Elymus elongatum</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 80 dnů SUCHO: 4, 7, 16 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-Q- TOF MS/MS | různá délka sucha | Gazanchian <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Cicer arietinum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 3 týdny SUCHO: 1, 2, 3, 4, 5, 6 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-Q- TOF MS/MS, analýza imunoblotů | zaměřeno na jaderný proteom | Pandey <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Gossypium hirsutum</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 45 dní SUCHO: 7 dnů P/OZ | SDS-PAGE | kromě sucha i následná obnova; srovnání citlivého a odolného genotypu | Parida <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Vitis vinifera</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 2 roky (řízky) SUCHO: 8, 16 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI- TOF MS/MS | kromě sucha i stres zasolením; různá délka sucha; srovnání různých genotypů (bez stanovení odolnosti); zaměřeno na proteom listů a vzrostého vrcholu stonku | Vincent <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Helianthus annuus</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: stádium 3. listu SUCHO: 4, 10 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI- TOF MS/MS | různá délka sucha; srovnání citlivého a odolného genotypu | Castillejo <i>et al.</i> 2008 |
| <i>Populus × euramericana</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 2 roky (řízky) SUCHO: 10 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI- TOF MS/MS | kromě sucha i stres zvýšenou teplotou | He <i>et al.</i> 2008 |
| <i>Zea mays</i> | PĚSTOVÁNÍ: neuvedeno STÁŘÍ: 6 dnů SUCHO: 24 hodin (PEG) | SDS-PAGE | různá intenzita sucha; srovnání různých genotypů (bez stanovení odolnosti); zaměřeno na proteom listu a kořene | Mohammadkhani <i>et al.</i> Heidari 2008 |
| <i>Populus × euramericana</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník/pole STÁŘÍ: 4 měsíce/4 roky (řízky) SUCHO: 18, 86 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-IT MS/MS | kromě sucha i následná obnova; srovnání různých genotypů (bez stanovení odolnosti) | Bonhomme <i>et al.</i> 2009a |
| <i>Populus × euramericana</i> | PĚSTOVÁNÍ: pole STÁŘÍ: 3,5 let SUCHO: 86 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-IT MS/MS | srovnání citlivých a odolných genotypů | Bonhomme <i>et al.</i> 2009b |

Tab. 1 – pokračování.

| Druh rostliny | Podmínky* | Metody** | Poznámka | Citace |
|---|--|--|--|--------------------------------------|
| <i>Triticum durum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 8 dnů SUCHO: 7 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS | kromě sucha i následná obnova | Caruso <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Quercus ilex</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 9 měsíců SUCHO: 7 dnů P/OZ | 2DGE; ESI-QQQ-IT MS/MS | kromě sucha i následná obnova | Echevarría-Zomeño <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Amaranthus hypochondriacus</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 22 dnů SUCHO: 7 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-QQQ-IT MS/MS | kromě sucha i následná obnova | Huerta-Ocampo <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 2 týdny SUCHO: 4 dny P/OZ | 2-DGE; MS (<i>detaily neuvedeny</i>), analýza imunoblotů | | Ke <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Arachis hypogaea</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 67 dnů SUCHO: 7 dnů P/OZ | 1-DGE a 2-DGE; MALDI-TOF MS nanoESI-Q-TOF MS/MS, analýza imunoblotů | kromě sucha i následná obnova; srovnání citlivých a odolných genotypů | Kottapali <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Triticum aestivum</i> | PĚSTOVÁNÍ: neuvedeno STÁŘÍ: stádium 2. listu SUCHO: 24 hodin (PEG) | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | kromě sucha i stres zasolením; srovnání inbredního rodiče a křížence; zaměřeno na proteom listu a kořene | Peng <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Populus cathayana</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 2 měsíce (řízky) SUCHO: 45 dnů P/OZ | 2-DGE; MS (<i>detaily neuvedeny</i>) | srovnání různých populací | Xiao <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Hippophae rhamnoides</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 2 roky SUCHO: 20 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS | | Xu <i>et al.</i> 2009 |
| <i>Zea mays</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: stádium 2. listu SUCHO: 26 hodin (PEG) | 2-DGE; MALDI-TOF MS | sucho v kombinaci se zvýšenou teplotou | Hu <i>et al.</i> 2010b |
| <i>Saccharum officinarum</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 3 měsíce SUCHO: 3 týdny P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS | srovnání citlivého a odolného genotypu | Jangpromma <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: neuvedeno STÁŘÍ: 3 měsíce SUCHO: 24 hodin (PEG) | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | různá intenzita sucha | Shu <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Selaginella tamariscina</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 30 dnů SUCHO: 1, 3, 5, 7 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | různá délka sucha; kromě sucha i následná obnova | Wang <i>et al.</i> 2010b |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: neuvedeno STÁŘÍ: 3 týdny SUCHO: 8 dnů (PEG) | 2-DGE; MALDI-TOF MS | | Xiong <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Poa pratensis</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 37 dnů SUCHO: 10 a 15 dnů P/OZ | DIGE; MS (<i>detaily neuvedeny</i>) | různá délka sucha; srovnání citlivého a odolného genotypu | Xu <i>et al.</i> Huang 2010a |
| <i>Agrostis stolonifera</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 37 dnů SUCHO: 28 dnů (PEG) | DIGE; MS (<i>detaily neuvedeny</i>) | srovnání citlivého a odolného genotypu | Xu <i>et al.</i> Huang 2010b |
| <i>Populus kangdingensis</i> , <i>P. cathayana</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 14 měsíců SUCHO: 37 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS | rozdíly mezi druhy | Yang <i>et al.</i> 2010a |
| <i>Carissa spinarum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: dospělé rostliny SUCHO: 5 dnů (P/OZ) | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS, 2-D Western blot | sucho v kombinaci se zvýšenou teplotou; kromě toho i následná obnova | Zhang <i>et al.</i> 2010a |
| <i>Populus cathayana</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 3 měsíce (řízky) SUCHO: 40 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | rozdíly mezi pohlavími | Zhang <i>et al.</i> 2010b |

Tab. 1 – pokračování.

| Druh rostliny | Podmínky* | Metody** | Poznámka | Citace |
|---|---|--|--|---------------------------------|
| <i>Citrullus lanatus</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 2 týdny SUCHO: 3 dny P/OZ | 2-DGE; ESI/APCI (neuvedeno)-IT MS/MS, analýza imunoblotů | | Akashi <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Medicago sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 91 dnů SUCHO: 7 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-IT MS/MS | | Aranjuelo <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Populus tremula</i> × <i>P. alba</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 3 měsíce (řízky) SUCHO: 8, 12 dnů P/OZ | DIGE; MALDI- TOF MS/MS | různá délka sucha; kromě sucha i následná obnova; zaměřeno na proteom listu a kambia | Durand <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Triticum aestivum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: stádium praporcového listu SUCHO: 5, 14, 24 dnů P/OZ | iTRAQ; ESI-Q- TOF MS/MS | různá délka sucha; kromě sucha i následná obnova; srovnání citlivého a odolných genotypů | Ford <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Helianthus annuus</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 3 dny SUCHO: 7 dnů (PEG) | 2-DGE; MALDI- TOF MS | | Fulda <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Agrostis stolonifera</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 70 dnů SUCHO: P/OZ až do dosažení 22, 18, 15, 10 a 5% SWC (celkem 14 dnů) | 2-DGE; MALDI- TOF MS | různá intenzita sucha; genotyp se zvýšenou expresí <i>ipt</i> genu pro syntézu cytokininů; zaměřeno na proteom listu a kořenů | Merewitz <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Sporobolus stapfianus</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 6 měsíců SUCHO: P/OZ až do dosažení 30% RWC | DIGE; ESI-IT MS/MS | | Oliver <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Citrullus lanatus</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 2 týdny SUCHO: 3 dny P/OZ | 2-DGE; ESI/APCI (neuvedeno)-IT MS/MS, analýza imunoblotů | sucho v kombinaci s vysokou ozářeností | Sanda <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Quercus robur</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 5 let SUCHO: 3, 8, 31, 36 dnů P/OZ | DIGE; MALDI- TOF MS/MS | různá délka sucha | Sergeant <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 30 dnů SUCHO: 3 dny P/OZ | 2-DGE; MALDI- TOF MS/MS | | Shu <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | PĚSTOVÁNÍ: neuvedeno, simulace stresu v laboratoři STÁŘÍ: neuvedeno SUCHO: 15 dnů (manitol) | SILIP, SDS- PAGE; nanoESI- Orbitrap-IT MS/MS | | Skirycz <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Zea mays</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: stádium 2. listu SUCHO: 8 hodin (PEG) | 2-DGE; MALDI- TOF MS | zaměřeno na membránové proteiny | Tai <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Lathyrus sativus</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 10 dnů SUCHO: 8 dnů (PEG) | 2-DGE; MALDI- TOF MS/MS | | Wu <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Cynodon dactylon</i> , <i>C. dactylon</i> × <i>C.</i> <i>transvaalensis</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 107 dnů SUCHO: 15 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI- TOF MS/MS ESI-IT MS/MS | srovnání citlivého a odolného genotypu | Zhao <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Eucalyptus alba</i> × neznámý druh <i>E. urophylla</i> × <i>E.</i> <i>grandis</i> | PĚSTOVÁNÍ: pole STÁŘÍ: 2 týdny (řízky) SUCHO: 7 týdnů P/OZ | 2-DGE; ESI-IT MS/MS | srovnání různých genotypů (bez stanovení odolnosti); zaměřeno na proteom listu a stonku | Bedon <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Gossypium herbaceum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 3 týdny SUCHO: P/OZ až do 75%, 50% a 35% RWC | 2-DGE; MALDI- TOF MS/MS | různá intenzita sucha | Deeba <i>et al.</i> 2012 |

Tab. 1 – pokračování.

| Druh rostliny | Podmínky* | Metody** | Poznámka | Citace |
|---|--|--|--|--|
| <i>Zea mays</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 2 týdny SUCHO: 8 hodin (manitol) | 2-DGE; MALDI-TOF MS | sucho v kombinaci s pěstováním ve tmě; ABA-deficientní genotyp; zaměřeno na chloroplastový proteom | Hu <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: pole STÁŘÍ: 30 dnů SUCHO: 20 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS | srovnání citlivého a odolného genotypu | Ji <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Triticum aestivum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 2 týdny SUCHO: 3 dny (PEG) | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | rostliny ošetřeny kyselinou salicylovou | Kang <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Festuca arundinacea</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: neuvedeno SUCHO: 3, 11 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-Orbitrap MS | různá délka sucha; kromě sucha i následná obnova; srovnání citlivých a odolných genotypů; zaměřeno na chloroplastový proteom | Kosmala <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 2 a 3 týdny SUCHO: 24, 48, 96, 192 hodin (PEG) | negelová separace, bez značení proteinů (intenzita iontů); ESI-IT MS | různá délka sucha; srovnání citlivých a odolných genotypů | Maksup <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Oryza sativa</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 35 dnů SUCHO: 10, 14 dnů P/OZ | negelová separace, bez značení proteinů (počítání spekter); ESI-IT MS/MS | různá délka sucha; kromě sucha i následná obnova | Mirzaei <i>et al.</i> 2012a |
| <i>Glycine max</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 3 dny SUCHO: 4 dny P/OZ, PEG | 2-DGE; ESI-Orbitrap-IT MS/MS | různá indukce sucha; zaměřeno na proteom listu, hypokotylu a kořene | Mohammadi <i>et al.</i> 2012a |
| <i>Musa accuminata</i> × <i>Musa balbisiana</i> | PĚSTOVÁNÍ: neuvedeno, simulace stresu v laboratoři STÁŘÍ: 4 týdny SUCHO: 48 hodin (sorbitol) | DIGE; ESI-IT MS/MS | srovnání různých genotypů (bez stanovení odolnosti) | Vanhove <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Hordeum vulgare</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 7 dnů SUCHO: 1 týden P/OZ | DIGE; MALDI-TOF MS | srovnání citlivého a odolného genotypu; zaměřeno na proteom listu a kořene | Wendelboe-Nelson <i>et Morris</i> 2012 |
| <i>Saccharum officinarum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: stádium 4.-6. listu SUCHO: 14 hodin (PEG) | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | | Zhou <i>et al.</i> 2012 |
| <i>Hordeum vulgare</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: stádium 4. listu SUCHO: 7 dnů P/OZ | DIGE; MALDI-TOF MS | srovnání citlivého a odolného genotypu | Ashoub <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Populus tremula</i> × <i>P. alba</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 10 týdnů (řízky) SUCHO: 7, 14, 21 a 28 dnů P/OZ | DIGE; MALDI-TOF MS/MS | sucho v kombinaci s ozónem; různá délka sucha | Bohler <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Triticum turgidum</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 4 týdny SUCHO: 9 dnů P/OZ | 2-DGE; ESI-IT MS/MS | srovnání různých genotypů (bez stanovení odolnosti) | Budak <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Vitis vinifera</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 2 roky (řízky) SUCHO: 4, 8, 12, 16 dnů P/OZ | negelová separace, bez značení proteinů (počítání spekter); ESI-IT MS/MS | různá délka sucha | Cramer <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Hordeum vulgare</i> | PĚSTOVÁNÍ: RK STÁŘÍ: 14 dnů SUCHO: 14 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | rostliny vystaveny <i>Piriformospora indica</i> | Ghabooli <i>et al.</i> 2013 |
| <i>Morus indica</i> | PĚSTOVÁNÍ: skleník STÁŘÍ: 5 měsíců SUCHO: 10 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | různá intenzita sucha | Guha <i>et al.</i> 2013 |

Tab. 1 – pokračování.

| Druh rostliny | Podmínky* | Metody** | Poznámka | Citace |
|---------------------------|---|---------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Hordeum vulgare</i> | <i>PĚSTOVÁNÍ</i> : RK <i>STÁŘÍ</i> : 30 dnů <i>SUCHO</i> : P/OZ až do dosažení 15% SWC | DIGE; MALDI-TOF MS/MS | sucho v kombinaci se zvýšenou teplotou; srovnání různých genotypů (bez stanovení odolnosti) | Rollins et al. 2013 |
| <i>Cynodon dactylon</i> | <i>PĚSTOVÁNÍ</i> : RK <i>STÁŘÍ</i> : 28 dnů <i>SUCHO</i> : 21 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS | kromě sucha i následná obnova; rostliny ošetřeny polyaminy | Shi et al. 2013 |
| <i>Quercus ilex</i> | <i>PĚSTOVÁNÍ</i> : skleník <i>STÁŘÍ</i> : 1 rok <i>SUCHO</i> : 28 dnů P/OZ | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | | Valero-Galván et al. 2013 |
| <i>Triticum sativa</i> | <i>PĚSTOVÁNÍ</i> : RK <i>STÁŘÍ</i> : stádium 2./poloviny 3. viditelného listu <i>SUCHO</i> : 72 hodin (PEG) | 2-DGE; MALDI-TOF MS/MS | kromě sucha i následná obnova; srovnání citlivého a odolného genotypu | Ye et al. 2013 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | <i>PĚSTOVÁNÍ</i> : skleník <i>STÁŘÍ</i> : 5 týdnů <i>SUCHO</i> : 12, 17 dnů P/OZ | DIGE; nanoESI-IT-Orbitrap MS/MS | srovnání citlivého a odolného genotypu | Zadražník et al. 2013 |

* Základní podmínky pěstování rostlin a simulace stresu suchem: **PĚSTOVÁNÍ**: podmínky, v jakých byly rostliny pěstovány (**RK** ... růstová komora); **STÁŘÍ**: stáří rostlin na začátku simulace sucha; **SUCHO**: délka periody sucha, které byly pokusné rostliny vystaveny, s uvedením toho, jak bylo sucho simulováno (manitol, sorbitol ... přidání manitolu nebo sorbitolu do růstového média; **PEG** ... přidání polyetylénglykolu do růstového média; **P/OZ** ... přerušení/omezení závlivky; **RWC** ... relativní obsah vody v listech; **SWC** ... obsah vody v půdě).

** Metody použité pro separaci a identifikaci proteinů: **1-DGE, 2-DGE** ... jednorozměrná/dvourozměrná gelová elektroforéza; **APCI** ... chemická ionizace za atmosférického tlaku; **DIGE** ... dvourozměrná diferenční gelová elektroforéza; **ESI** ... elektrosprejová ionizace; **IT** ... iontová past; **iTRAQ** ... značení pomocí izobarických značek pro relativní a absolutní kvantifikaci proteinů; **MALDI** ... laserová desorpce/ionizace pomocí matrice; **MS** ... hmotnostní spektrometrie, **Q** ... lineární kvadrupol; **SILIP** ... metabolické značení proteinů stabilními izotopy *in planta*; **SDS-PAGE** ... elektroforéza na polyakrylamidovém gelu za použití dodecylsulfátu sodného jako detergentu; **TOF** ... průletový analyzátor.

Stáří rostlin použitých ve stresových studiích shrnutých v **Tab. 1** bylo také rozmanité, avšak ve více než polovině případů nebyly rostliny vystavené suchu starší než pět týdnů a stres u nich tedy začal před dosažením dospělosti (jednalo se o zemědělské plodiny, které mají delší vývoj, jako je rýže, kukuřice, pšenice a jiné obiloviny a také luštěniny). Celkově pak většina pokusných rostlin nebyla starší než šest měsíců, což zahrnovalo i některé traviny či řízky dřevin zmíněné v několika pracích. Některé dřeviny (topol, dub, vinná réva) byly na začátku období sucha staré v řádu let.

Pouze u několika prací byl stres suchem indukován zcela uměle, použitím PEG (celkem 13 prací) nebo pomocí manitolu (Skirycz *et al.* 2011) či sorbitolu (Vanhove *et al.* 2012). Délka stresu u cca dvou třetin studií tohoto typu nepřesáhla 72 hodin. Ve zbylých případech byl stres suchem navozen klasicky omezením nebo přerušením závlivky na různě dlouhá období. Některé tyto práce se zaměřovaly pouze na jednu délku období sucha. Velice časté bylo navození krátkodobého stresu (např. tří- či pětidenního) nebo naopak dlouhodobějšího stresu (např. 10 či 15 dnů sucha) v závislosti na vybraném druhu rostliny. Zvolená délka stresu zřejmě závisela na předpokládané schopnosti rostlinného druhu čelit dehydrataci. V případě dřevin jsem našla i studie i s delší periodou stresu, např. u topolu až 86 dní (Bonhomme *et al.* 2009a, b). Některé práce měly navíc za cíl porovnání různých dlouhých period bez přísunu vody u jednoho rostlinného druhu, často to byly dvě, případně i více různě dlouhých období sucha. Zde také příslušní autoři pravděpodobně vycházeli z vlastností konkrétního druhu rostliny a přizpůsobili tomu zároveň rozdíly v délce trvání sucha, aby výsledky co nejvíce vypovídaly o průběhu stresové reakce. Rozdíly mezi trváním různě dlouhých období sucha se v těchto studiích nejčastěji pohybovaly v rozpětí 1 až 4 dnů, což by předpokládalo, že by se mohl očekávaný rozdíl v reakci rostlin v závislosti délce stresu již v rámci tohoto rozpětí projevit. Našla jsem však i práce, kde byl rozdíl mezi krátkodobým a dlouhodobým stresem sedm a více dní. Dále pak v 16 studiích byl rostlinám po skončení stresu obnoven přísun vody a sledována tak možnost reaklimace.

Pro pěstování rostlin, u nichž byla dehydratace vyvolána přirozeným způsobem, bylo většinou zvoleno prostředí, které buď umožňovalo úplnou kontrolu podmínek pro pěstování, tj. růstová komora, nebo alespoň jejich částečnou kontrolu, tj. skleník. Počet jednotlivých studií byl v tomto případě téměř vyrovnaný. Pouze v pěti pracích (Hajheidari *et al.* 2005, Bonhomme *et al.* 2009a, b, Bedon *et al.* 2012,

Ji *et al.* 2012) byly jako prostředí pro růst rostlin zvoleny polní podmínky, navzdory tomu, že jde o nejpřirozenější prostředí pro pěstování. Důvodem byl nepochybně největší počet proměnných faktorů, které mohou reakci rostlin na suchu v těchto podmínkách ovlivňovat.

Až na několik výjimek se většina prací zabývala pouze účinkem sucha bez dalších stresových faktorů. Čtyři práce stres suchem spojily navíc s účinkem vysoké teploty (He *et al.* 2008, Hu *et al.* 2010b, Zhang *et al.* 2010a, Rollins *et al.* 2013), tři se salinitou (Ali *et al.* 2006, Vincent *et al.* 2007, Peng *et al.* 2009), v dalších pracích byla dehydratace spojená se zvýšenou ozářeností (Sanda *et al.* 2011) nebo naopak s pěstováním ve tmě (Hu *et al.* 2012) a v jedné studii i s vystavením rostlin ozónu (Bohler *et al.* 2013). Ghabooli *et al.* (2013) nechali kořeny rostlin ječmene před vystavením stresu kolonizovat endofytickou houbou *Piriformospora indica* (Sav. Verma, Aj. Varma, Rexer, G. Kost & P. Franken) a popsali pak u rostlin zvýšenou odolnost k suchu. Podobně Kang *et al.* (2012) ošetřili rostliny pšenice kyselinou salicylovou pro zesílení odolnosti k nedostatku vody a Shi *et al.* (2013) polyaminy putrescinem, sperminem nebo spermidinem.

Co se týče genotypové variability, výzkumníci často sledovali pouze reakci jednoho genotypu jednoho rostlinného druhu v konkrétních podmínkách. Z celkového počtu studií uvedených v **Tab. 1** bylo ale 17 zaměřeno na srovnání reakce na suchu u citlivých a odolných genotypů, 10 dalších prací sledovalo reakci různých genotypů bez předchozího stanovení jejich odolnosti k suchu a ve dvou pracích (Peng *et al.* 2009, Riccardi *et al.* 1998) byla porovnávána reakce inbredních rodičů s kříženci. V jedné práci se setkáme s porovnáním dvou různých populací jednoho druhu topolu (Xiao *et al.* 2009) a v další studii se vzájemným srovnáním reakce na stres u dvou druhů topolu (Yang *et al.* 2010a). Geneticky modifikované rostliny byly použity zřídka. Pouze Merewitz *et al.* (2011) použili ve studii transgenní genotyp psinečku výběžkatého exprimující *ipt* gen pro syntézu cytokininů a Hu *et al.* (2012) použili ABA-deficientní genotyp kukuřice.

Kromě změn listového proteomu se pět studií uvedených v **Tab. 1** současně zabývalo i změnami proteomu kořene (Mohammakhani *et al.* 2008, Peng *et al.* 2009, Merewitz *et al.* 2011, Wendelboe-Nelson *et al.* 2012) a jedna sledovala proteomické změny kromě listů a kořenů navíc i v hypokotylu (Mohammadi *et al.* 2012a). Další tři práce se kromě listů zajímaly o proteom vzrostného vrcholu (Vincent *et al.* 2007), stonku (Bedon *et al.* 2012) nebo kambia (Durand *et al.* 2011). Čtyři práce se zaměřily místo na celkový proteom listu výhradně na proteiny jádra (Pandey *et al.* 2007), buněčných membrán (Tai *et al.* 2011) nebo chloroplastů (Hu *et al.* 2012, Kosmala *et al.* 2012).

Změny rostlinného proteomu v důsledku dehydratace jsou obvykle analyzovány především v listech a touto problematikou jsem se zabývala i v uvedeném přehledu. Zejména v posledních letech však byly publikovány i práce, které jsou zaměřeny na jiné rostlinné orgány. Změna proteomu kořene v důsledku sucha byla sledována např. u rostlin kukuřice (Hu *et al.* 2011, Liu *et al.* 2013), pšenice (Alvarez *et al.* 2014), rýže (Mirzaei *et al.* 2012b), řepky (Mohammadi *et al.* 2012b), vigny zlaté (Sengupta *et al.* 2011) nebo sóji (Alam *et al.* 2010, Mohammadi *et al.* 2012a). Vliv sucha na proteom stonku byl studován u rostlin pšenice (Bazargani *et al.* 2011), rýže (Muthurajan *et al.* 2010) nebo lupiny bílé (Pinheiro *et al.* 2005). Proteomu celé nadzemní části mladých rostlin ječmene (tj. listy i stonek) se věnovali Kausar *et al.* (2012). Dále lze nalézt práce zaměřené na změny proteinů v semenech různých rostlin (Ge *et al.* 2012, Jiang *et al.* 2012, Valdes *et al.* 2013) či změny v jiných rostlinných částech, jako jsou např. prašníky květů rýže (Liu *et al.* 2011), kořenové noduly sóji (Gil-Quintana *et al.* 2013) či xylémová šťáva kukuřice (Alvarez *et al.* 2008).

Jaké byly výsledky výše uvedených studií listového proteomu z hlediska hlavních skupin proteinů, u nichž sucho indukovalo kvalitativní nebo kvantitativní změny? Při stresu suchem bývá někdy pozorováno snížení celkového obsahu proteinů. Yang *et al.* (2010b) ale popsali v listech dvou druhů topolu vystavených nedostatku vody nárůst celkového množství rozpustných proteinů, přičemž tento nárůst byl vyšší u druhu, který byl lépe adaptován na suchu. Hladina rozpustných proteinů narostla během časně fáze dehydratace také u rostlin kukuřice, což bylo pravděpodobně způsobeno expresí nových proteinů indukovaných stresem. Prodloužení periody sucha v této studii ale způsobilo pokles obsahu celkových proteinů, přičemž míra poklesu závisela na intenzitě dehydratace a délce stresové periody (Mohammadkhani *et al.* 2008). Obdobné kolísání obsahu celkových proteinů závislé na délce vodního deficitu bylo u kukuřice pozorováno již dříve (Riccardi *et al.* 1998). Také u rostlin cukrové třtiny stresovaných suchem se obsah celkových proteinů významně nelišil v porovnání s kontrolou až do doby 11 hod po začátku sucha. Výrazný nárůst obsahu proteinů byl u stresovaných rostlin pozorován po 14 hod, ale po dalších 10 hod se množství proteinů v listech opět snížilo (Zhou *et al.* 2012).

Vodní deficit může způsobit změnu v obsahu proteinů prostřednictvím změn v metabolismu aminokyselin, změn genové exprese na úrovni transkripce, stability mRNA nebo translace a konečně změn stability proteinů souvisejících s posttranslačními modifikacemi, skládáním proteinů za účasti chaperonů, transportem na místa určení a degradací v proteazómu i mimo něj (Chaves *et al.* 2003, Vaseva *et al.* 2012). Analýza listového proteomu lipnice ukázala, že u genotypu, který byl lépe přizpůsobený podmínkám nedostatku vody, došlo k nižšímu poklesu množství proteinů podílejících se na metabolismu aminokyselin ve srovnání s citlivým genotypem (Xu *et al.* 2010). Také u různých kultivarů pšenice byly proteiny, které mají vztah k transportu a metabolismu aminokyselin, při reakci na stres suchem regulovány různým způsobem, což se týkalo především methioninsyntázy (Budak *et al.* 2013). Tento enzym katalyzuje přenos metylové skupiny z 5-metyltetrahydrofolátu na homocystein za vzniku methioninu, který je pak dále přeměněn na S-adenosylmethionin. Ten je univerzálním donorem transmetylace nukleových kyselin, proteinů, lipidů a jiných metabolitů, jako jsou kompatibilní soluty glycinbetain a polyaminy (Narita *et al.* 2004, Ravanel *et al.* 2004). Ye *et al.* (2013) také u odolného genotypu pšenice pozorovali v listech stresovaných rostlin zvýšenou expresi methioninsyntázy a reduktiozomerázy ketolových aminokyselin, což je další klíčový enzym při syntéze aminokyselin. Autoři se domnívají, že tyto změny mohou přímo vylepšit adaptaci rostlin na sucho prostřednictvím zvýšení syntézy rozpustných proteinů (Ye *et al.* 2013). Exprese dalších enzymů majících roli při syntéze aminokyselin, jako je glutaminsyntáza, cysteinsyntáza a acetoxyhydroxyacidsyntáza, byla při suchu indukována i u rostlin fazolu (Zadrazilnik *et al.* 2013).

Také množství některých proteinů souvisejících s účinností genové exprese na úrovni transkripce se u rostlin vystavených nedostatku vody změnilo. U rostlin cizrný např. po dehydrataci došlo k výraznému poklesu množství jednoho transkripčního faktoru typu ABA/EREBP, který má roli při růstu a vývoji rostlin. Jiné transkripční faktory ze skupin bZIP/AREB nebo WRKY byly naopak u stresovaných rostlin indukovány (Pandey *et al.* 2007). U rostlin bavlny sucho indukovalo expresi dalšího ABA/EREBP transkripčního faktoru (Deeba *et al.* 2012). Také u ječmene (Wendelboe-Nelson *et al.* 2012) nebo topolu (Yang *et al.* 2010a) bylo identifikováno několik transkripčních faktorů, které by během stresu suchem mohly kontrolovat expresi genů regulujících odpověď na stres. Rovněž zvýšení hladin histonů se může podílet na kontrole genové exprese a u rostlin cizrný byly po 48 hodinách dehydratace postupně indukovány histony H3 a H2B (Pandey *et al.* 2007). Histon H2B byl dehydratací indukován také u citlivého genotypu podzemnice olejné (Kottapalli *et al.* 2009). I jeden retrotranspozónový protein byl u jednoho z tolerantních genotypů podzemnice olejné při stresu suchem indukován. Retrotranspozóny se účastní tvorby siRNA, které mohou zpětně umlčovat specifické geny a tak regulovat genovou expresi (Kottapalli *et al.* 2009).

Během stresu suchem vzrostla u rostlin slunečnice hladina RNA-vazebných proteinů, které obsahují na N-konci RNA rozpoznávací motivy a na C konci oblast bohatou na glyciny. Jejich přesná funkce dosud není úplně jasná, ale existují důkazy pro jejich působení během odpovědi na stres (Fulda *et al.* 2011). RNA-vazebné proteiny mohou zřejmě vázat a stabilizovat specifické transkripty a mohou tak hrát důležitou roli v rostlinné morfogenezi a buněčné regulaci (Fedoroff 2002). U citlivého genotypu lipnice luční bylo po 10 a 15 dnech sucha sníženo množství těchto proteinů, zatímco u genotypu odolného k suchu jejich hladina zůstala ve srovnání s kontrolou beze změny (Xu *et al.* 2010a). Autoři této studie předpokládají, že odolný genotyp může mít díky tomu stabilnější transkripty nebo větší kapacitu pro opravy RNA či její ochranu před degradací. Vyšší hladina různých proteinů interagujících s RNA byla pozorována také u stresovaných rostlin kukuřice (Tai *et al.* 2011).

Několik studií, které se zabývaly reakcí listového proteomu na sucho, přineslo informace o změnách hladin ribozomálních proteinů; jejich výsledky se však liší. U vinné révy nastal jasný pokles hladiny ribozomálních proteinů během působení stresu suchem (Cramer *et al.* 2013). Stejně tak byla exprese ribozomálních proteinů snížena v reakci na sucho u rostlin fazolu (Zadrazilnik *et al.* 2013). Tai *et al.* (2011) pozorovali výrazně snížené množství ribozomálního proteinu L28 v listech kukuřice vystavené suchu simulovanému ošetřením PEG. Pokles hladiny ribozomálního proteinu L21 nastal v listech rostlin rýže, jejichž kořeny byly vystaveny částečnému nebo celkovému osmotickému stresu (Shu *et al.* 2010). Podobně Zhao *et al.* (2011) pozorovali pokles hladiny dvou ribozomálních proteinů (chloroplastový ribozomální protein S1 a cytosolický ribozomální protein L12) u genotypu troskutu prstnatého citlivého k suchu; ale zároveň také pozorovali významný nárůst hladiny jiného chloroplastového ribozomálního proteinu (S6). Další protein malé ribozomální podjednotky (S40) byl zahrnut do skupiny proteinů s významným zvýšením množství v důsledku sucha u trávy *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011) a množství ribozomálního proteinu L5 narostlo také u dvou druhů topolu vystavených suchu (Yang *et al.* 2010a). Do jaké míry tedy dostupnost ribozomálních proteinů v

podmínkách stresu suchem přispívá k celkovým změnám v množství proteinů, není na základě uvedených výsledků zcela jasné.

Také množství dalších složek proteosyntetického aparátu, především různých translačních faktorů, se při stresu nedostatkem vody může měnit a tyto změny se mohou lišit u druhů/genotypů citlivých a odolných k suchu. U vinné révy došlo v důsledku sucha k výraznému poklesu hladiny aminoacyl-tRNAsyntázy, enzymu, který je důležitý pro translaci (Cramer *et al.* 2013). Zvýšení hladiny eukaryotického translačního iniciačního faktoru 5A-3 (eIF5A-3) během sucha u druhu *Carissa spinarum* mohlo být odpovědné za rezistenci k suchu a zvýšené teplotě (Zhang *et al.* 2010a). U rostlin kukuřice množství translačního iniciačního faktoru 5A-1/2 při dehydrataci pokleslo a autoři předpokládají, že to bylo příčinou pozorovaného poklesu množství celkových proteinů (Tai *et al.* 2011). Další proteiny spojené s translací (např. elongační faktory) vykazovaly u rostlin rýže naopak snížení množství v reakci na suchu, což mohlo být, spolu s poklesem hladin proteinů spojených s transkripcí, příčinou omezení biosyntézy proteinů pozorované v této studii (Shu *et al.* 2011). Zhao *et al.* (2011) pozorovali nárůst hladiny elongačního faktoru EF-Tu u genotypu trojklápníku prstnatého citlivého k suchu, avšak u odolného genotypu ne. U rostlin ječmene po působení sucha hladina dvou translačních elongačních faktorů naopak vzrostla pouze u odolného genotypu (Ashoub *et al.* 2013).

Mezi další proteiny, u nichž byly často pozorovány změny v důsledku sucha, patřily HSP a jiné chaperony, podílející se na správném skládání proteinů. Jejich akumulaci lze na základě výsledků proteomických studií považovat za obecný příznak odpovědi rostlin na nedostatek vody a zřejmě souvisí i s lepší odolností vůči tomuto stresoru. Tyto proteiny patřily do nejvíce zastoupené kategorie proteinů, jejichž množství během stresu suchem a zvýšenou teplotou narostlo u druhu *Carissa spinarum* (Zhang *et al.* 2010a). HSP proteiny, jejichž hladina se při stresu suchem zvýšila u rostlin melounu, zahrnovaly všech pět hlavních rodin HSP. Deset z patnácti proteinů, u nichž byla pozorována změna obsahu, patřilo přitom do rodiny sHSP (Akashi *et al.* 2011). Také u rostlin rýže byla hladina některých chaperonů účastnících se správného skládání proteinů zvýšena, čímž bylo zřejmě podpořeno přežití rostlin a jejich růst v podmínkách nedostatku vody (Shu *et al.* 2011, Mirzaei *et al.* 2012a). U ječmene byly v důsledku sucha zvýšeny hladiny proteinů z rodin HSP90 a HSP100, a to jak u citlivého, tak u odolného genotypu, zatímco exprese HSP70 byla zvýšena pouze u odolného genotypu (Ashoub *et al.* 2013). V práci na pšenici bylo pozorováno, že sHSPs se během stresu suchem a vysokou teplotou výrazně akumuluji v odolných genotypech pšenice ve srovnání s citlivými (Salekdeh *et al.* Komatsu 2007). Podobné změny se vyskytly v hladině HSP v závislosti na genotypu v listech osmi variant topolu vystavených nedostatečnému přísunu vody (Bonhomme *et al.* 2009a). Nárůst výskytu několika HSP byl pozorován také u kultivaru lipnice luční odolného vůči suchu, avšak nikoli v citlivém kultivaru (Xu *et al.* Huang 2010a). Jiná studie identifikovala u pšenice vystavené nedostatku vody deset proteinů z kategorie chaperonů se změněnou expresí. Osm z nich vykazovalo významný nárůst množství u jednoho z odolných kultivarů, pouze jeden z nich také u jiného odolného kultivaru a u kultivaru citlivého k suchu se zvýšil obsah čtyř z těchto proteinů (Ford *et al.* 2011).

Přímá degradace proteinů je dalším možným důvodem pozorovaných změn v obsahu celkových proteinů, navozených suchem. Obsah leucinaminopeptidázy byl během dehydratace zvýšen pouze u citlivého genotypu ječmene, nikoli u genotypu odolného k suchu (Ashoub *et al.* 2013). Nárůst množství proteinů z rodiny ubikvitinů (podílejících se na označování proteinů pro degradaci v proteazómu) byl zaznamenán v listech laskavce vystaveného suchu (Huerta-Ocampo *et al.* 2009). Také Jangpromma *et al.* (2012) pozorovali zvýšené množství ubikvitinů u kultivarů cukrové třtiny vykazujících lepší odolnost vůči tomuto stresovému faktoru, spolu s indukcí jednoho z inhibitorů serinproteáz. Degradace proteinů často souvisí s programovanou buněčnou smrtí, která je jedním ze společných obranných mechanismů rostlin při působení různých abiotických stresorů. U rostlin rýže byl při stresu nedostatkem vody zvýšen obsah WD40 proteinů (Maksup *et al.* 2012). WD40 repetice jsou krátké 40-aminokyselinové motivy a jsou obvykle nalezeny u enzymů typu E3 ubikvitinligáz, které fungují v buněčném cyklu a apoptóze (Yee *et al.* Goring 2009). V tomto případě může být vyšší rychlost buněčné smrti znakem citlivosti na stres suchem (Maksup *et al.* 2012). V listech vojtěšky byla při vystavení nedostatku vody pozorována zvýšená syntéza jedné z proteazómových podjednotek (20S) (Aranjuelo *et al.* 2011). Naopak u druhu *Sporobolus stapfianus* se množství podjednotky 20S proteazómu snížilo (Oliver *et al.* 2011). U rostlin pšenice byla během sucha specificky exprimována regulační podjednotka 26S proteazómu a autoři se domnívají, že zvýšená hydrolýza proteinů a jejich recyklace by mohl být dobrý obranný mechanismus proti suchu (Ye *et al.* 2013). Zvýšení hydrolýzy proteinů bylo také pozorováno v listech kukuřice při mírném stresu suchem (Tai *et al.* 2011).

Další kategorií proteinů, úzce související s regulací genové exprese, byly proteiny účastníci se buněčné signalizace. Hladiny signalizačních proteinů, jako je 14-3-3 protein, různé proteinkinázy a fosfatázy, byly při působení stresu suchem u rostlin cizrný zvýšeny již po krátkodobém vystavení rostlin dehydrataci (Pandey *et al.* 2007). Devět malých GTP-vazebných proteinů, jejichž obsah se v důsledku sucha zvýšil, bylo identifikováno u rostlin rýže; u většiny z nich k této změně došlo především po působení extrémně silného sucha (Mirzaei *et al.* 2012a). U podzemnice olejné byly během vodního stresu také detekovány změny v obsahu různých signalizačních proteinů – nukleoziddifosfátkinázy, která hraje roli v přenosu signálu zprostředkovaného GTP, proteinu vázajícího kalmodulin, který je receptorem na změny v koncentraci buněčných Ca^{2+} iontů, cyklofilinu, který má kromě role při skládání proteinů i důležitou úlohu v buněčné signalizaci, myoinozitol-1-fosfátsyntázy, která katalyzuje syntézu inozitol-1-fosfátu, a lipoxygenázy, která se podílí na biosyntéze kyseliny jasmonové, což je signální molekula aktivující rostlinné obranné mechanismy (Kottapalli *et al.* 2009). V případě lipoxygenázy hladina tohoto enzymu narostla pouze u genotypů odolných k suchu, v případě myoinozitol-1-fosfátsyntázy a proteinu vázajícího kalmodulin došlo naopak k nárůstu obsahu pouze u citlivého genotypu (Kottapalli *et al.* 2009).

U rostlin rýže vystavených dehydrataci bylo identifikováno několik proteinů z rodiny akvaporinů, proteinů regulujících pohyb vody přes buněčné membrány, jejichž obsah také reagoval na vodní deficit. Šlo o šest izoform akvaporinů typu PIP a tři izoformy akvaporinů typu TIP. Většina z nich byla indukována až při vysoké intenzitě sucha (Mirzaei *et al.* 2012a).

Ve řadě prací zabývajících se analýzou listového proteomu v důsledku sucha autoři zaznamenali především nárůst obsahu ochranných proteinů patřících do skupiny dehydrinů. Jejich akumulace při vodním deficitu byla zjištěna např. u kukuřice (Mohammadkani *et al.* 2008, Hu *et al.* 2010a), cukrové třtiny (Jangpromma *et al.* 2010), pšenice (Ford *et al.* 2011), vinné révy (Cramer *et al.* 2013) nebo fazolu (Zadraznik *et al.* 2013). Rozdíly mezi genotypy citlivými a odolnými k suchu v akumulaci těchto proteinů nebyly popsány, nárůst jejich množství je tedy spíše obecnou odpovědí na dehydratační stres než speciálním obranným mechanismem (Zhao *et al.* 2011).

Další kategorií proteinů, u nichž byly při analýzách listového proteomu pozorovány změny jejich množství v důsledku sucha, byly ochranné enzymy antioxidantního systému. Změny v obsahu těchto enzymů uváděné v proteomických studiích, které shrnuje **Tab. 1**, ale nejsou jednoznačné a zřejmě závisí na typu enzymu, druhu rostliny i na intenzitě stresu. Například u rýže byl jeden izoenzym CAT vysoce zastoupen u kontrolních rostlin, ale jeho obsah spolu s intenzitou sucha klesal. Obsah APX byl zvýšen při extrémním suchu a dále narostla i hladina GR, přičemž tento enzym nebyl u kontrolních rostlin detekován (Mirzaei *et al.* 2012a). V jiné studii byly u rostlin rýže při stresu suchem indukovány i enzymy GPOX a thioredoxinperoxidáza (Xiong *et al.* 2010). U rostlin bavlny sice některé antioxidantní enzymy (SOD and CAT) vykazovaly během stresu suchem odlišnou aktivitu ve srovnání s kontrolou, proteomická analýza ale neodhalila žádné významné změny v jejich množství. Oproti tomu bylo u těchto rostlin zvýšeno množství GST, polyfenoloxidázy a peroxiredoxinu (Deeba *et al.* 2012). Také u rostlin melounu se při suchu zvyšovaly hladiny enzymů funkčně spojených s glutathionem: GST, GPX a laktoylglutathionylázy. Dále byl u těchto rostlin během sucha zvýšen i obsah proteinu homologního s thioredoxinem (Akashi *et al.* 2011). Thioredoxin je dalším obranným proteinem, jehož množství může být dehydratací ovlivněno. Zvýšené množství tohoto proteinu bylo pozorováno u odolného genotypu fazolu vystaveného suchu, avšak u citlivého genotypu se vyskytovala jiná izoforma, jejíž množství se v suchu snižovalo (Zadraznik *et al.* 2013). I u jiných rostlinných druhů byly zjištěny vnitrodruhové rozdíly v obsahu ochranných antioxidantních proteinů. Proteomické studie na kultivarech pšenice (Peng *et al.* 2009, Hajheidari *et al.* 2007) a psinečku (Xu *et al.* 2010b) s odlišnou odolností k suchu ukázaly, že se tyto kultivary liší ohledně změny množství GST, CAT nebo APX. Stejně tak tomu bylo v případě tří forem SOD (chloroplastové a cytosolické Cu/Zn-SOD a mitochondriální Mn-SOD), jejichž obsah se při stresu suchem měnil u dvou odolných a jednoho citlivého kultivaru pšenice. U jednoho z odolných genotypů byl patrný významný nárůst hladin všech tří enzymů podílejících se na detoxifikaci a syntéze antioxidantů (Ford *et al.* 2011).

Při odpovědi topolu na stres suchem byly indukovány také tzv. PR proteiny („pathogenesis-related proteins“ nebo „disease-related proteins“), které jsou součástí rostlinných obranných systémů především proti biotickým stresorům (Xiao *et al.* 2009). Dva proteiny typu lipocalin byly nalezeny při stresu suchem u rostlin troskutu. Jeden byl indukován pouze u odolného genotypu a druhý u citlivého i odolného genotypu. Zvýšení množství lipocalinů při odpovědi na suchu může souviset s ochranou rostlin před oxidativním stresem pomocí xantofylového cyklu (Zhao *et al.* 2011).

U rostlin slunečnice vystavených suchu došlo k výrazné indukci enzymu caffeoyl-koenzym A-3-O-metyltransferázy, která je odpovědná za syntézu feruoylovaných polysacharidů v dráze biosyntézy ligninu (Fulda *et al.* 2011). Lignifikace se někdy také řadí mezi příznaky rostlinné odpovědi na suchu. U rostlin *Carissa spinarum* ale byla hladina tohoto enzymu po vystavení rostlin nedostatku vody snížena (Zhang *et al.* 2010a) a Vincent *et al.* (2005) také pozorovali sníženou lignifikaci v listech kukuřice stresované suchem. V jiné studii na kukuřici pozorovali Tai *et al.* (2011) zvýšení hladiny tzv. agregačního faktoru β -glukosidázy. β -glukosidáza hydrolyzuje glukosidy a uvolňuje monolignoly pro syntézu ligninu. Funkce těchto proteinů může být důležitá pro lignifikaci buněčné stěny při stresové reakci (Tai *et al.* 2011).

Mnoho studií popsalo také změny v dalších drahách metabolismu sacharidů během stresu suchem. Hladiny některých enzymů glykolýzy a glukoneogeneze byly v rostlinách pšenice vystavených nedostatku vody výrazně zvýšeny (Caruso *et al.* 2009). U druhu *Carissa spinarum* naopak množství dvou glykolytických enzymů při dehydrataci pokleslo, což mohlo být příznakem narušeného energetického metabolismu ve stresových podmínkách (Zhang *et al.* 2010a). Také u rostlin laskavce se obsah jednoho z klíčových glykolytických enzymů během sucha snížil (Huerta-Ocampo *et al.* 2009). Množství fruktokinázy se při vodním stresu u slunečnice naopak více než ztrojnásobilo. Tento enzym katalyzuje fosforylaci fruktózy na fruktóza-6-fosfát, který může být dále metabolizován glykolýzou a případně používán na biosyntézu sacharózy nebo škrobu (Fulda *et al.* 2011). U vranečku se během sucha akumulovaly další enzymy metabolismu sacharidů, jako např. sacharózasyntáza, ADP-glukózapyrofosforyláza, UDP-glukóza-4-epimeráza; autoři této studie na základě toho usoudili, že akumulace sacharidů chrání při stresu integritu buňky tím, že sacharidy stabilizují různé proteiny během dehydratace (Wang *et al.* 2010b). U rostlin melounu stres suchem indukoval expresi fosfoglukomutázy. Tento enzym katalyzuje přeměnu mezi glukóza-1-fosfátem a glukóza-6-fosfátem a přispívá k tvorbě zásoby glukóza-6-fosfátu pro syntézu sacharózy (Akashi *et al.* 2011). Zvýšená akumulace sacharózasyntázy, což je enzym, podílející se na syntéze sacharózy, byla během sucha pozorovaná i u citlivého genotypu ječmene (Ashoub *et al.* 2012). Stejně tak došlo k indukci tohoto enzymu u rýže při působení intenzivního stresu suchem (Shu *et al.* 2010), nebo u topolu (Durand *et al.* 2011). V některých případech došlo během stresu suchem také ke snížení hladin enzymů podílejících se na syntéze škrobu, např. u kukuřice (Tai *et al.* 2011) nebo pšenice (Caruso *et al.* 2009). Změny v hladinách enzymů fotosyntetické fixace CO₂ jsou podrobněji popsány dále v kap. 2.2.2.2.

Některé proteomické studie zaznamenaly i změny v hladinách proteinů podílejících se na metabolismu mastných kyselin. V rostlinách jsou známy dvě β -oxidační dráhy: mitochondriální, která je katalyzovaná acyl-koenzym A-dehydrogenázou, a peroxizomální, která je katalyzovaná acyl-koenzym A oxidázou. Acyl-koenzym A-dehydrogenáza nebyla za podmínek optimální dostupnosti vody u rostlin rakytníku detekovatelná, avšak její množství se zvýšilo při stresu suchem. Je možné že suchu v důsledku snížení fotosyntézy způsobilo u těchto rostlin nedostatek glukózy a vyvolalo tak „přepnutí“ metabolismu uhlovodíků na využívání mastných kyselin a proteinů a stimulaci β -oxidace (Xu *et al.* 2009). Naopak acetyl-koenzym A-karboxyláza je enzymem biosyntézy lipidů. Tento enzym byl detekován při stresu suchem pouze u jednoho genotypu podzemnice olejné, který byl odolný k tomuto stresoru (Kottapalli *et al.* 2009).

U trávy druhu *Sporobolus stapfianus* bylo při stresu nedostatkem vody pozorováno rovněž snížené množství aktinu, což je jeden z hlavních proteinů cytoskeletu. Dále u tohoto druhu pokleslo během působení sucha i množství proteinu FtsZ1, který se účastní dělení plastidů (Oliver *et al.* 2011).

2.2.2. Změny fotosyntetických proteinů v důsledku sucha

Vzhledem k tomu, že se ve své vlastní práci věnuji především fotosyntéze, zaměřila jsem se při studiu publikací věnujících se proteomickým analýzám listů v souvislosti se suchem podrobněji právě na tuto skupinu proteinů. Podle jejich funkce lze fotosyntetické proteiny, u kterých byly nalezeny průkazné kvantitativní (případně i kvalitativní) změny v souvislosti se stresem suchem, rozdělit na proteiny účastnící se primární a sekundární fáze fotosyntézy, a v rámci těchto hlavních skupin do několika podskupin.

2.2.2.1. Proteiny primárních fotosyntetických procesů

Komplexy světlosběrných antén

Světlosběrné systémy LHCI (podjednotky Lhca1-4) a LHCII (podjednotky Lhcb1-6) jsou v tylakoidních membránách rostlinných chloroplastů asociovány s oběma fotosystémy (v případě Lhcb1 a 2 dokonce mohou migrovat mezi PSII a PSI při tzv. stavových přechodech). Jednotlivé podjednotky v těchto komplexech zajišťují prostorovou orientaci mnoha molekul Chl *a* a *b* a hlavních fotosyntetických karotenoidů. Funkcí světlosběrných systémů je zachycení kvant záření a přenos takto získané excitační energie do RC fotosystémů (Neilson *et al.* Durnford 2010).

V několika proteomických studiích zabývajících se vlivem sucha na rostliny autoři popisují, že po působení stresu suchem došlo k nárůstu množství některých LHC proteinů. Tento jev byl pozorován např. u rostlin kukuřice (Tai *et al.* 2011), rýže (Ali *et al.* Komatsu 2006, Shu *et al.* 2010), moruše (Guha *et al.* 2013), nebo u trávy druhu *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011). Bylo možno pozorovat i závislost množství těchto proteinů na délce sucha. U rostlin topolu krátkodobý stres suchem způsoboval nárůst hladiny proteinu Lhcb1, jehož obsah se s délkou stresu dále zvyšoval. U těchto rostlin došlo zároveň ke zvýšení množství jiného ze světlosběrných proteinů antény PSII, a to bez ohledu na délku stresu. Ve srovnání s tím obsah proteinu Lhca3 při mírném stresu suchem sice vzrostl, avšak při dlouhodobějším klesal (Durand *et al.* 2011).

Zatímco výše uvedené práce popisují zvýšení hladin proteinů LHC komplexů jako důsledek stresu suchem, jiní autoři u těchto proteinů zaznamenali úbytek. Jednalo se např. o rostliny pšenice, a to genotypy citlivé i odolné k suchu (Ford *et al.* 2011). Podobný jev byl pozorován v případě LHCI komplexu také u psinečku výběžkatého, opět bez ohledu na genotyp (Xu *et al.* Huang 2010b). Snížení množství proteinů světlosběrných antén v důsledku sucha bylo dále zjištěno i u rostlin ječmene (Ghabooli *et al.* 2013) a dubu (Valero-Galván *et al.* 2013). Pokles hladiny LHC proteinů během dehydratace by podle některých autorů mohl být obecnou známkou citlivosti rostlin vůči stresu, poškození a degradace světlosběrných antén. Může s tím však také souviset strategie, jak zabránit poškození fotosyntetického aparátu, a to snížením velikosti světlosběrných antén, aby tak pokleslo množství absorbované světelné energie a nedošlo k přerodování fotosyntetického elektron-transportního řetězce (Ford *et al.* 2011).

Genotypová variabilita byla patrná u rostlin fazolu, kde po stresu suchem tolerantní genotyp vykazoval nárůst množství jednoho ze světlosběrných proteinů spojených s PSI, zatímco citlivý genotyp nikoli (Zadrazník *et al.* 2013). Odlišnou reakci LHC proteinů u genotypu citlivého a odolného k suchu pozorovali u rostlin troskutu také Zhao *et al.* (2011), kteří zjistili, že pouze v případě citlivého genotypu došlo u těchto proteinů k poklesu jejich množství. Peng *et al.* (2009) pozorovali pokles obsahu proteinu Lhcb6 u hybridního genotypu pšenice vystaveného dehydrataci, avšak stresované rostliny inbrední linie měly hladinu tohoto proteinu vyšší ve srovnání s kontrolními.

Fotosystém II

Při necyklickém přenosu elektronů v tylakoidních membránách začíná fotosyntetický elektron-transportní řetězec v PSII. Tento pigment-proteinový komplex je složen ze dvou hlavních podjednotek D1 (PsbA) a D2 (PsbD), na které jsou vázány primární a sekundární přenašeče elektronů (molekuly Chl *a*, feofytinu a plastochinonu), dvou podjednotek vnitřních světlosběrných antén CP47 (PsbB) a CP43 (PsbC), které pomáhají usměrnit excitační energii na molekuly Chl v RC, dále dvou podjednotek cytochromu *b*₅₅₉ (PsbE, PsbF), který se účastní cyklického elektronového transportu (CET) kolem PSII, tří periferně vázaných podjednotek OEC komplexu (PsbO, PsbP, PsbQ), který katalyzuje rozklad vody za uvolnění molekulárního kyslíku, a mnoha dalších minoritních podjednotek. V PSII RC je excitační energie zachycená světlosběrnými anténami využita k excitaci elektronu a jeho přenosu v první části fotosyntetického elektron-transportního řetězce (Suorsa *et al.* 2006, Ifuku *et al.* 2010, Pospíšil 2011, Pagliano *et al.* 2013).

Nejvýraznější změny v proteinech PSII v důsledku stresu suchem byly pozorovány u proteinů OEC. PsbO protein stabilizuje a řídí katalytický Mn klastr při rozkladu vody a reguluje turnover proteinu D1 PSII RC. Pokles množství tohoto proteinu při stresu suchem byl pozorován u rýže (Shu *et al.* 2010). Ve většině případů však došlo při stresu suchem ke zvýšení jeho obsahu, např. u kukuřice (Riccardi *et al.* 2004, Tai *et al.* 2011), pšenice (Caruso *et al.* 2009), psinečku výběžkatého (Merewitz *et al.* 2011), melounu (Akashi *et al.* 2011), vinné révy (Cramer *et al.* 2013), hrachoru (Wu *et al.* 2011),

moruše (Guha *et al.* 2013) či dubu letního (Sergeant *et al.* 2011). V případě psinečku pozorovali v jiné práci Xu *et al.* (2010b) u citlivého genotypu naopak pokles hladiny tohoto proteinu, ovšem jejich studie simulovala dehydrataci pomocí PEG (vystavení rostlin PEG v délce 28 dní), kdežto v práci Merewitz *et al.* (2011) se jednalo o čtrnáctidenní stres simulovaný omezením závlivky.

Rozdíly mezi výsledky různých prací u stejného druhu rostliny byly v případě proteinu PsbO nalezeny i u dubu cesmínovitého, kde u dlouhodobého stresu suchem obsah tohoto proteinu poklesl (Valero-Galván *et al.* 2013), avšak u krátkodobějšího stresu byl pozorován jak nárůst, tak pokles v závislosti na izoformě proteinu (Echevarría-Zomeño *et al.* 2009). Tři izoformy PsbO, které se lišily svou expresí, byly identifikovány u druhu *Carissa spinarum* při působení sucha v kombinaci s vysokou teplotou. Při stejných podmínkách stresu suchem vykazovala jedna izoforma sníženou hladinu a další dvě zvýšenou hladinu (Zhang *et al.* 2010a).

U proteinu PsbO byly pozorovány i rozdíly mezi genotypy lišícími se citlivostí ke stresu suchem. U citlivého genotypu lipnice došlo k poklesu množství tohoto proteinu ve srovnání s odolným genotypem, kde došlo naopak k jeho nárůstu (Xu *et al.* 2010a). Stejně tak tomu bylo i u fazolu (Zadrazník *et al.* 2013). Ford *et al.* (2011), kteří studovali tři kultivary pšenice, zjistili, že u jednoho z odolných kultivarů byla hladina PsbO při stresu suchem zvýšena, avšak při prodloužení stresu naopak snížena. U jiného tolerantního kultivaru a u citlivého kultivaru zůstala hladina tohoto proteinu nezměněna (Ford *et al.* 2011).

Podobně jako protein PsbO reagoval na stres suchem i protein PsbP. K zvýšení jeho množství došlo v důsledku sucha u rostlin rýže (Ali *et al.* Komatsu 2006), citlivého i tolerantního genotypu psinečku (Xu *et al.* 2010b), pýrovníku (Gazanchian *et al.* 2007), sóji (Mohammadi *et al.* 2012a), tolerantního genotypu podzemnice olejné (Kottapalli *et al.* 2009), moruše (Guha *et al.* 2013) a také u rostlin topolu, u nichž však při prodloužení stresové periody obsah tohoto proteinu klesl (Durand *et al.* 2011). Dále byl pokles hladiny PsbP pozorován u jiného druhu topolu (pouze u samčích rostlin) (Zhang *et al.* 2010b), u dubu cesmínovitého (Echevarría-Zomeño *et al.* 2009, Valero-Galván *et al.* 2013) a laskavce (Huerta-Ocampo *et al.* 2009).

Genotypová odlišnost byla v případě PsbP pozorována u rostlin fazolu, kde u genotypu odolného k suchu došlo při stresu ke zvýšení hladiny tohoto proteinu, zatímco u citlivého genotypu tomu bylo naopak (Zadrazník *et al.* 2013). Něco podobného bylo zjištěno i u troskutu, kde obsah PsbP klesl u citlivého genotypu a u tolerantního genotypu zůstal beze změny (Zhao *et al.* 2011). Velký nárůst množství tří izoform PsbP tohoto proteinu zejména při krátkodobějším stresu suchem byl zaznamenán u genotypu lipnice, který byl citlivý k suchu, zatímco u odolného genotypu bylo zvýšení obsahu jen mírné a u jedné izoformy došlo dokonce k poklesu jejího množství (Xu *et al.* 2010a). Při srovnání tří kultivarů pšenice s odlišnou tolerancí k suchu došlo při krátkodobém stresu u jednoho z odolných kultivarů k nárůstu hladin proteinů PsbP i PsbQ, zatímco u druhého odolného kultivaru došlo k jejich poklesu. Při dlouhodobějším stresu pak došlo ke zvýšení množství PsbQ proteinu i u citlivého kultivaru a při dalším prodloužení stresu i u druhého odolného kultivaru (Ford *et al.* 2011).

Cytochromový komplex a plastocyanin

Komplex cytochromů *b₆f* slouží k přenosu elektronů z PSII na PSI. Je místem aktivního čerpání H⁺ v elektron-transportním řetězci, čímž se podílí na vytvoření protonového gradientu přes tylakoidní membránu. Skládá se z cytochromu *b₆* (PetB), cytochromu *f* (PetA), Rieskeho Fe-S proteinu (PetC), podjednotky IV (PetD) a dalších menších podjednotek. Od cytochromového komplexu k PSI elektrony dále přenáší plastocyanin (PetE), malý mobilní protein obsahující měď (Anderson 1992).

Několik proteomických studií zabývajících se stresem suchem popsalo změny v obsahu podjednotek cytochromového komplexu v důsledku působení tohoto stresového faktoru. Ke snížení množství Rieskeho Fe-S proteinu došlo např. u rostlin rýže (Salekdeh *et al.* 2002, Ke *et al.* 2009, Shu *et al.* 2011), laskavce (Huerta-Ocampo *et al.* 2009) a při čtrnáctidenním vystavení PEG u psinečku výběžkatého (Merewitz *et al.* 2011). Při dehydrataci indukované působením PEG v délce 28 dnů došlo u tohoto druhu naopak ke zvýšení množství tohoto proteinu, u genotypu citlivého k suchu přitom obsah Rieskeho Fe-S proteinu narostl více než u genotypu tolerantního (Merewitz *et al.* 2011). U lipnice při patnáctidenním stresu suchem množství Rieskeho Fe-S proteinu narostlo prokazatelně pouze u genotypu citlivého k suchu (Xu *et al.* 2010a). Sanda *et al.* (2011) u rostlin melounu pozorovali, že při stresu suchem v kombinaci s vysokou ozářeností došlo k indukci nové izoformy Rieskeho Fe-S proteinu s isoelektrickým bodem v kyselejší oblasti, a navrhli, že by tato izoforma mohla potlačovat lineární elektronový transport a chránit tak PSI před fotoinhibicí. Kvalitativní změny

fotosyntetických proteinů by tak podle těchto autorů mohly přepnout fotosyntetický elektronový transport z „normálního“ do „odolného“ módu (Sanda *et al.* 2011).

Pozorován byl také nárůst hladiny cytochromu *f* u psinečku výběžkatého, avšak pouze u genotypu citlivého k suchu (Xu *et al.* 2010b). Podobně tomu bylo u lipnice při desetidenním stresu suchem, kdy byl u stresovaných rostlin zaznamenán vyšší nárůst množství tohoto proteinu u citlivého genotypu než u genotypu odolného k suchu (Xu *et al.* 2010a).

Zvýšená akumulace plastocyaninu nastala u dubu letního při dlouhodobějším stresu suchem, ale při dalším prodloužení sucha hladina tohoto proteinu opět poklesla (Sergeant *et al.* 2011).

Fotosystém I

PSI souhrnem svých funkcí představuje plastocyanin/ferredoxin-oxidoreduktázu a zajišťuje přenos elektronů z plastocyaninu na ferredoxin. Komplex PSI se skládá z podjednotek PsA a PsB, na které je vázán dimer Chl *a* (P700), Fe-S centrum a další molekuly Chl *a* sloužící jako vnitřní světlosběrné antény, dále podjednotky PsC, na kterou jsou vázána další Fe-S centra, a nejméně osmi dalších polypeptidů, které jsou pro funkci tohoto systému nezbytné (Schöttler *et al.* 2011).

Autoři, kteří studovali změny listového proteomu v důsledku sucha, popsali reakci na stres suchem pouze u několika podjednotek PSI. Snížení hladiny PsC podjednotky nastalo při dehydrataci u rostlin ječmene (Ghabooli *et al.* 2013), při dlouhodobějším stresu suchem také u odolných kultivarů pšenice, zatímco u citlivého kultivaru zůstal tento protein bez výrazných změn (Ford *et al.* 2011). Dále bylo patrné snížení jeho hladiny u odolného genotypu lipnice, avšak u citlivého genotypu došlo naopak ke zvýšení množství PsC (Xu *et al.* 2010a).

U rostlin topolu se během dehydratace zvýšila hladina PsD podjednotky, která je důležitá pro interakci s mobilním ferredoxinem (He *et al.* 2008). Naopak u sóji její obsah poklesl (Mohammadi *et al.* 2012a). U rostlin melounu vystavených stresu suchem v kombinaci s vysokou ozářeností došlo buď ke snížení nebo zvýšení množství tohoto proteinu v závislosti na izoformě (Sanda *et al.* 2011).

Protein PsF vykazoval při krátkodobém i dlouhodobém stresu suchem zvýšenou expresi u dubu letního (Sergeant *et al.* 2011). Tento protein zajišťuje interakci s plastocyaninem a zabezpečuje tak přenos elektronů z cytochromového komplexu (Farkas *et al.* 2011).

U lipnice byl pozorován také nárůst obsahu PsK podjednotky PSI, jejíž funkce není zatím objasněna, a to jak u genotypu citlivého k suchu, tak u genotypu odolného k suchu (Xu *et al.* 2010a).

Ferredoxin a ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktáza

Z PSI jsou elektrony přenášeny na ferredoxin (PetF), malý, ve vodě rozpustný protein s navázaným Fe-S centrem. Flavoprotein ferredoxin-NADP⁺ oxidoreduktáza (FNR, PetH), asociovaná s tylakoidní membránou, redukuje NADP⁺ na NADPH za pomoci elektronů z ferredoxinu (Hanke *et al.* 2013).

V případě ferredoxinu došlo v důsledku dehydratace k poklesu jeho množství např. u genotypu cukrové třtiny odolného k suchu (Jangpromma *et al.* 2010) nebo u psinečku výběžkatého (Merewitz *et al.* 2011).

Hladina FNR byla po působení sucha zvýšena např. v listech kukuřice (Tai *et al.* 2011) a vinné révy (Cramer *et al.* 2013) či topolu (Bonhomme *et al.* 2009b). Ve většině studií zabývajících se listovým proteomem v souvislosti se suchem ale autoři pozorovali naopak snížení množství tohoto proteinu, např. u pšenice (Caruso *et al.* 2009), psinečku výběžkatého (Merewitz *et al.* 2011), při dlouhodobějším stresu suchem u citlivého i odolného genotypu lipnice luční (Xu *et al.* 2010a), u podzemnice olejné (opět bez ohledu na odolnost genotypu k suchu) (Kottapalli *et al.* 2009), nebo topolu (Xiao *et al.* 2009, Durand *et al.* 2011). Dále při stresu suchem v kombinaci s vysokou ozářeností hladina tohoto enzymu poklesla i v listech melounu (Sanda *et al.* 2011).

Budak *et al.* (2013) pozorovali při působení sucha na tři genotypy pšenice změnu exprese tří izoform FNR. Množství všech tří izoform tohoto proteinu u všech sledovaných genotypů kleslo, s výjimkou jedné izoformy, jejíž hladina u jednoho z genotypů v důsledku sucha vzrostla (Budak *et al.* 2013). Ve jiné studii provedené na pšenici také dvě izoformy FNR reagovaly opačně: hladina jedné při suchu vzrostla, u druhé se snížila (Kang *et al.* 2012).

Nahromaděné protony a jejich gradientem tvořená protonmotorická síla jsou z největší části využívány na tvorbu ATP komplexem ATP-syntázy. Tylakoidní ATP-syntáza sestává ze složky CF₀, transportující H⁺ přes membránu, a složky CF₁, zabezpečující vlastní syntézu ATP z ADP a anorganického fosfátu. CF₁ je tedy vlastně spřáhovacím faktorem, který spojuje syntézu ATP s fotosyntetickým přenosem elektronů. CF₁ je oligomer tvořený pěti typy polypeptidových podjednotek: α (AtpA), β (AtpB), γ (AtpC), δ (AtpD) a ϵ (AtpE), přičemž α a β jsou v komplexu přítomny ve třech kopiích. Složka CF₀ tvoří kanál pro prostup H⁺ tylakoidní membránou, je silně hydrofóbní a skládá se z podjednotek I (AtpI), II (AtpG), III (AtpH) a IV (AtpF), přičemž podjednotka III je přítomna ve dvanácti kopiích (McCarty *et al.* 2000).

Pokles celkového množství podjednotek komplexu chloroplastové ATP-syntázy v důsledku sucha byl pozorován u huseníčku (Skirycz *et al.* 2011). Hladina α podjednotky se snížila také u rostlin kukuřice (Tai *et al.* 2011, Hu *et al.* 2012), pšenice (Caruso *et al.* 2009), rýže (Shu *et al.* 2011), u genotypu troskutu citlivého k suchu (Zhao *et al.* 2011), u citlivého i odolného genotypu fazolu (Zadrafnik *et al.* 2013), u topolu (Yang *et al.* 2010a) a u blahovičnicku bez ohledu na genotyp (Bedon *et al.* 2012). Naopak zvýšené množství tohoto proteinu v důsledku sucha bylo zaznamenáno u citlivého i odolného genotypu ječmene (Ashoub *et al.* 2012) a u bavlníku (Deeba *et al.* 2012). U tráv druhu *Sporobolus stapfianus* bylo nalezeno sedm izoform tohoto proteinu, jejichž množství se vlivem sucha zvýšilo (Oliver *et al.* 2011). U rostlin melounu stres suchem v kombinaci s vysokou ozářeností způsobil změnu exprese několika izoform tohoto proteinu, z čehož v jednom případě šlo o nárůst a v ostatních případech o pokles množství (Sanda *et al.* 2011). Dvě izoformy tohoto proteinu, které vykazovaly opačnou reakci na stres suchem, byly nalezeny také u rostlin sóji (Mohammadi *et al.* 2012a).

V případě β podjednotky ATP-syntázy bylo snížení jejího obsahu vlivem sucha popsáno u pšenice (Ye *et al.* 2013), vojtěšky (Aranjuelo *et al.* 2011), melounu (Sanda *et al.* 2011) a dubu (Valero-Galván *et al.* 2013). Také při dlouhodobém působení sucha byla hladina β podjednotky u stresovaných rostlin topolu kanadského nižší ve srovnání s kontrolními rostlinami (Bonhomme *et al.* 2009a). Opačná situace nastala při kratším stresu u dvou jiných druhů topolů, kde se obsah tohoto proteinu zvýšil (Xiao *et al.* 2009, Bohler *et al.* 2013; v případě druhé studie šlo o nárůst množství dvou izoform tohoto proteinu). Také u druhu *Sporobolus stapfianus* byly popsány čtyři izoformy tohoto proteinu vykazující nárůst množství během sucha (Oliver *et al.* 2011). U genotypu lipnice luční odolného k suchu byla hladina β podjednotky ATP-syntázy během krátkodobějšího stresu suchem zvýšená ve srovnání s kontrolními rostlinami, zatímco při delším stresu poklesla. U citlivého genotypu byl obsah této podjednotky v listech stresovaných rostlin vždy pod úrovní kontroly bez ohledu na délku stresu (Xu *et al.* 2010a). Podobně jako u α podjednotky, byly i u β podjednotky nalezeny dvě izoformy tohoto proteinu, které vykazovaly opačnou reakci na stres suchem, např. u sóji (Mohammadi *et al.* 2012a) či u kukuřice (Tai *et al.* 2011).

Jen v málo případech byly pozorovány změny v důsledku sucha u jiných podjednotek ATP-syntázy. Snížena byla např. hladina prekurzoru γ podjednotky ATP-syntázy u kukuřice (Tai *et al.* 2011) nebo dubu letního (Sergeant *et al.* 2011), δ podjednotky u cukrové třtiny (Zhou *et al.* 2012), či podjednotky ϵ při stresu suchem v kombinaci s vysokou ozářeností u melounu (Sanda *et al.* 2011). Zvýšení množství δ podjednotky ATP-syntázy při stresu suchem v kombinaci s vysokou teplotou popsali u druhu *Carissa spinarum* Zhang *et al.* (2010).

V případě CF₀ složky ATP-syntázy jsem našla jedinou zmínku o snížení hladiny podjednotky I v důsledku stresu suchem u druhu *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011).

2.2.2.2. Proteiny fotosyntetické fixace CO₂

Rubisco, aktiváza Rubisco a chaperony Rubisco

Hlavním enzymem cyklu fotosyntetické fixace uhlíku je Rubisco. Je to nejčastěji se vyskytující protein v rostlinách a jeden z nejdůležitějších enzymů účastnících se fotosyntézy. U vyšších rostlin se skládá z osmi velkých (RbcL) a osmi malých (RbcS) podjednotek. Katalyzuje karboxylaci RuBP na kyselinu 3-fosfoglycerovou (Von Caemmerer *et al.* 2000, Roy *et al.* 2000). Kromě karboxylázové má i oxygenázovou aktivitu, což je spojeno s procesy fotorespirace (Douce *et al.* 2000). Jeho množství i aktivita jsou působením stresu suchem obvykle sníženy, závisí

to však na síle a délce stresu, na rostlinném druhu a na odolnosti rostliny k stresu (Flexas *et al.* 2006b). Mezi druhové rozdíly v reakci Rubisco na sucho byly v proteomických studiích pozorovány např. u topolu. Degradace RbcL stejně jako významný pokles účinnosti asimilace CO₂ byl pozorován u druhu *P. cathayana*, ale ne u blízkého příbuzného druhu *P. kangdingensis*, což podle autorů naznačuje vyšší citlivost fotosyntézy k vodnímu deficitu u prvního druhu topolu (Yang *et al.* 2010a).

Obsah RbcL (nebo jeho prekursoru) poklesl vlivem sucha u rýže (Ali *et al.* 2006), pšenice (Peng *et al.* 2009), u tolerantního i citlivého genotypu psinečku (Xu *et al.* 2010b), u citlivého genotypu troskutu (Zhao *et al.* 2011), dále také u laskavce (Huerta-Ocampo *et al.* 2009) a při dlouhodobějším stresu suchem u topolu (Durand *et al.* 2011). U rostlin kukuřice vystavených suchu v kombinaci s vysokou ozářeností bylo nalezeno snížené množství RbcL a zároveň zvýšený obsah fragmentů této podjednotky (Hu *et al.* 2012).

Jiné proteomické studie prováděné na rostlinách stresovaných vodním deficitem přinesly opačné výsledky. U dubu letního byl při stresu suchem pozorován nárůst množství podjednotek Rubisco, a to při mírné i silné intenzitě stresu (Sergeant *et al.* 2011). Autoři interpretovali významný nárůst intenzity skvrn reprezentujících RbcL a RbcS tak, že se rostliny zprvu snaží se stresem bojovat. Dočasné zvýšení obsahu Rubisco může být způsob, jak čelit jeho inaktivaci (Bedon *et al.* 2012). Zvýšení exprese RbcL i RbcS nebo pouze RbcL při stresu suchem bylo pozorováno také u pšenice (Caruso *et al.* 2009, Kang *et al.* 2012, Ye *et al.* 2013), rýže (Ji *et al.* 2012), podzemnice olejné (Kottapalli *et al.* 2009) nebo topolu (Bonhomme *et al.* 2009b). Zvýšení hladiny RbcS v důsledku sucha bylo zaznamenáno u cukrové třtiny (Zhou *et al.* 2012) a u ječmene (Ghabooli *et al.* 2013).

Snížení obsahu RbcL a naopak zvýšení obsahu RbcS bylo pozorováno u melounu (Sanda *et al.* 2011). Opačný případ nastal v případě topolu *P. cathayana*, kde během sucha narostla hladina prekursoru RbcL a poklesla hladina RbcS (Xiao *et al.* 2009), a totéž bylo zaznamenáno u pšenice (Caruso *et al.* 2009).

Genotypové rozdíly ve změnách obsahu RbcL při stresu nedostatkem vody byly pozorovány u pšenice, kde u citlivého a jednoho z odolných kultivarů množství RbcL v důsledku sucha kleslo, zatímco u druhého odolného kultivaru s prodloužením sucha obsah tohoto proteinu narůstal (Ford *et al.* 2011). U genotypu ječmene citlivějšího k suchu byl zjištěn výraznější negativní vliv sucha na obsah velké podjednotky Rubisco, než tomu bylo u odolného genotypu (Ashoub *et al.* 2012). Xu *et al.* (2010a) v proteomické analýze lipnice luční vystavené nedostatku vody pozorovali změnu exprese tří izoform RbcL, z čehož obsah dvou z nich byl při stresu snížen u odolného genotypu a obsah třetí poklesl naopak u citlivého genotypu. Při současném působení sucha a vysoké teploty byly různé izoformy RbcL odlišně reagující na tento typ stresu nalezeny i u druhu *Carissa spinarum* (Zhang *et al.* 2010a).

V jiné studii stresové reakce provedené na třech kultivarech pšenice byla zvýšena hladina velké podjednotky Rubisco. Ve srovnání s hladinou proteinů však byla hladina mRNA pro tento protein v rostlinách stresovaných suchem snížena, a to u všech tří kultivarů. Jedním z vysvětlení může podle autorů být to, že za normálních podmínek rostlinné buňky přechovávají vysokou hladinu transkriptů Rubisco a během stresu jsou tyto transkripty rychle překládány do proteinů, což vede k nízké hladině transkriptů, ale k vysoké hladině proteinů. Dále je možné, že jsou transkripty Rubisco při vnímání stresového signálu rychle degradovány pro recyklaci, kdežto degradace existujících proteinů Rubisco probíhá mnohem pomaleji. Detekce několika izoform Rubisco naznačovala fragmentaci, což mohlo být znakem probíhajících degračních procesů (Budak *et al.* 2013).

Při studiu skvrn na gelu z 2-DGE vzniklého analýzou proteomu v listech dubu letního stresovaného suchem se několik skvrn jevílo pouze jako fragmenty velkého řetězce Rubisco a jejich intenzita výrazně vzrostla. Autoři vysvětlují příčiny degradace Rubisco buď indukcí této degradace zvýšeným množstvím ROS, nebo v důsledku běžné náhrady deaktivovaných Rubisco proteinů. V rozsahu molekulární hmotnosti, v níž by se RbcL mělo vyskytovat, bylo identifikováno několik jiných skvrn, jejichž intenzita mírně, byť statisticky nevýznamně, poklesla (Sergeant *et al.* 2011). Také u fazolu byly čtyři skvrny na gelu z 2-DGE identifikovány jako produkty částečné degradace RbcL v důsledku vodního deficitu. Avšak tyto skvrny byly přítomné i u nestresovaných rostlin. To naznačuje, že degradace mohla nastat nikoli jako důsledek stresu, ale jako vedlejší efekt při extrakci proteinů. Další možností je, že degradace Rubisco byl v tomto případě přirozený proces, protože rozpad Rubisco byl detekován v mnoha dalších proteomických studiích i u nestresovaných rostlin (Zadraznik *et al.* 2013). U jednoho křížence topolu vystaveného zároveň suchu a vysoké teplotě bylo zaznamenáno zvýšení celkové hladiny RbcL pravděpodobně také spíše výsledkem nárůstu množství degračních produktů (He *et al.* 2008) a stejně tak tomu bylo u pýrovníku (Gazanchian *et al.* 2007).

V aktivním stavu udržuje Rubisco činnost chloroplastového proteinu Rubisco aktivázy (RCA). Aktivace Rubisco probíhá vazbou Mg^{2+} iontu a CO_2 molekuly v nekatalytickém místě Rubisco (Von Caemmerer *et al.* Quick 2000, Roy *et al.* Andrews 2000). RCA usnadňuje odstraňování různých substrátů, které blokují navázání RuBP či brání karbamylaci. Chrání vazebná místa Rubisco před inhibicí a tak usnadňuje konformační změny závislé na ATP, které otevřou uzavřená vazebná místa. Ta jsou pak více přístupná a usnadňují disociaci inhibujících sacharidfosfátů (Robinson *et al.* Portis 1989, Wang *et al.* Portis 1992, Roy *et al.* Andrews 2000). RCA je normálně přítomna v buňkách ve dvou izoformách: větší (RCA_L) a menší (RCA_S), přičemž RCA_L je indukována a více stabilní než RCA_S při stresu zvýšenou teplotou (Wang *et al.* 2010a).

Obsah prekurzoru RCA byl působením sucha zvýšen u kukuřice (Tai *et al.* 2011), což podle autorů ukazuje na vyšší aktivační stav tohoto proteinu, který má vliv na aktivitu Rubisco. Dále byla hladina tohoto enzymu vlivem sucha zvýšena u rýže (Salekdeh *et al.* 2002, Ji *et al.* 2012), dubu (Echevarría-Zomeño *et al.* 2009) a u genotypu fazolu odolného k suchu (Zadrazník *et al.* 2013). Obsah RCA byl účinkem sucha naopak snížen u rostlin pšenice (Caruso *et al.* 2009, Kang *et al.* 2012), cukrové třtiny (Jangpromma *et al.* 2010), sóji (Mohammadi *et al.* 2012a), jedné skupiny genotypů topolu (Bonhomme *et al.* 2009b) a také v jiné studii prováděné na dubu letním, a to bez ohledu na délku stresu (Sergeant *et al.* 2011). Několik izoform tohoto enzymu bylo pozorováno u lipnice luční, kdy u genotypu citlivého i odolného k suchu byly hladiny všech izoform vlivem kratší i delší periody sucha sníženy, až na jednu izoformu, která měla u odolného genotypu při krátkodobém působení sucha zvýšenou expresi (Xu *et al.* Huang 2010a).

Sucho často indukuje také pokles obsahu jednoho z proteinů, který s Rubisco přímo interaguje a slouží jako molekulární chaperon, potřebný pro správné složení oligomerních proteinů z jejich podjednotek (Roy *et al.* Andrews 2000). Tento protein se označuje jako „Rubisco subunit binding protein“ (RSBP) a má dvě podjednotky (α a β). Ke snížení obsahu RSBP β v důsledku sucha došlo např. u pšenice (Caruso *et al.* 2009, Kang *et al.* 2012), bavlny (Deeba *et al.* 2012), odolného genotypu fazolu (Zadrazník *et al.* 2013) a dále u dvou genotypů blahovičnicku (Bedon *et al.* 2012). Při dehydrataci se snížil také obsah RSBP α u jedné skupiny genotypů topolu (Bonhomme *et al.* 2009b), naopak u rýže (Shu *et al.* 2011) a u odolného genotypu ječmene (Wendelboe-Nelson *et al.* Morris 2012) se vlivem sucha množství tohoto proteinu zvýšilo.

U některých rostlin byla při dehydrataci pozorována obdobná tendence změn u Rubisco a proteinů souvisejících s jeho funkcí. Obsah RbcL, RCA a RSBP α během stresu suchem souběžně poklesl u vojtěšky (Aranjuelo *et al.* 2011). Exprese těchto proteinů (dokonce několika izoform) a navíc i RSBP β se snížila také u trávy druhu *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011). Ke společnému snížení hladiny RbcL a RCA došlo také u psinečku (Merewitz *et al.* 2011) a u huseníčku navíc poklesl obsah i RbcS (Skirycz *et al.* 2011). Naopak zvýšení množství RbcL a zároveň i RCA u rostlin stresovaných suchem nastalo u moruše (Guha *et al.* 2013) a také u rýže bez ohledu na intenzitu stresu (Shu *et al.* 2010).

Enzymy redukční fáze Calvinova cyklu

Enzym 3-fosfoglycerátkináza (PGK) katalyzuje přenos fosfátu z ATP na kyselinu 3-fosfoglycerovou, která vzniká činností Rubisco. Kyselina 1,3-bisfosfoglycerová, která takto vzniká, je dále za spotřeby NADPH v reakci katalyzované 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenázou (GAPDH) zredukována na 3-fosfoglyceraldehyd. Ten je enzymem trióza-fosfátizomerázou (TPI) izomerizován do ketonické formy na dihydroxyacetonfosfát, který je z chloroplastů částečně transportován do cytosolu a je využíván pro glykolýzu, Krebsův cyklus, syntézu hexóz a dalších sacharidů. PGK funguje u vyšších rostlin jako monomer, chloroplastová GAPDH jako heterotetramer složený ze dvou kopií podjednotek A a B, a TPI jako homodimer. Aktivita GAPDH je regulována prostřednictvím thioredoxinového systému (Martin *et al.* 2000).

Studie zabývající se analýzou listového proteomu u rostlin stresovaných suchem odhalily změny v množství všech tří enzymů redukční fáze Calvinova cyklu. Hladina PGK byla u rostlin stresovaných suchem vyšší oproti kontrole v případě pšenice (Caruso *et al.* 2009), kukuřice (Tai *et al.* 2011, Hu *et al.* 2012), ječmene (Ghabooli *et al.* 2013), trávy *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011), vinné révy (Cramer *et al.* 2013) a bez ohledu na genotypovou rozdílnost i u topolu (Bonhomme *et al.* 2009b). Naopak u odolného i citlivého genotypu psinečku výběžkatého obsah tohoto enzymu v důsledku sucha poklesl (Xu *et al.* Huang 2010b).

V případě GAPDH můžeme rozlišit cytosolickou a chloroplastovou formu enzymu. U psinečku při dehydrataci narostlo množství chloroplastové GAPDH B, avšak pokleslo množství chloroplastové GAPDH A a cytosolické GAPDH (Merewitz *et al.* 2011). V další studii zabývající se tímto rostlinným druhem poklesla u rostlin stresovaných suchem hladina chloroplastové GAPDH ve srovnání s kontrolou, a to jak u citlivého, tak u odolného genotypu (Xu *et al.* 2010b). Rostliny genotypu fazolu citlivého k suchu vykazovaly zvýšenou expresi cytosolické formy GAPDH, zatímco u odolného genotypu zůstala hladina enzymu na úrovni kontrolních rostlin (Zadrazník *et al.* 2013). Xu *et al.* (2010a) pozorovali u lipnice luční v důsledku vodního deficitu pokles hladin dvou izoform chloroplastové GAPDH A, přičemž u odolného genotypu hladiny obou izoform klesly až při dlouhodobějším stresu a u citlivého genotypu vykazovala jedna izoforma sníženou expresi již během mírného stresu. Stejně tak tomu bylo i u chloroplastové GAPDH B (Xu *et al.* 2010a). U genotypu troskutu prstnatého vyznačujícího se větší citlivostí k nedostatku vody se zvýšila hladina cytosolické formy GAPDH, zatímco množství chloroplastové formy pokleslo jak u citlivého, tak u odolného genotypu (Zhao *et al.* 2011). Další proteomické studie chloroplastovou a cytosolickou formu tohoto enzymu neodlišovaly. Nárůst množství GAPDH bylo možné pozorovat u kukuřice (Tai *et al.* 2011), rýže (bez ohledu na intenzitu stresu) (Shu *et al.* 2010), trávy druhu *Sporobolus stapfianus*, kde byly zjištěny dvě izoformy tohoto enzymu (Oliver *et al.* 2011) stejně jako u vojtěšky (Aranjuelo *et al.* 2011), a dále u vinné révy (Cramer *et al.* 2013) a topolu (Yang *et al.* 2010a). V jiných studiích provedených na topolu naopak množství tohoto enzymu v důsledku sucha kleslo (Bonhomme *et al.* 2009a, Durand *et al.* 2011) a obdobný pokles byl pozorován i u kukuřice vystavené suchu v kombinaci s vysokou ozářeností (Hu *et al.* 2012).

Podmínky sucha v několika případech měnily i expresi proteinu TPI. Většinou byl pozorován pokles jeho hladiny, jako např. u pšenice (Kang *et al.* 2012), kukuřice (Tai *et al.* 2011), ječmene (Wendelboe-Nelson *et al.* 2012), psinečku (Merewitz *et al.* 2011), rostliny *Carissa spinarum* (Zhang *et al.* 2010a) a dvou druhů dubu (Sergeant *et al.* 2011, Echevarría-Zomeño *et al.* 2009). V jiné studii zaměřené na proteomickou analýzu listů dubu byla naopak hladina tohoto enzymu zvýšena (Valero-Galván *et al.* 2013). Dále byl nárůst množství TPI v důsledku sucha zaznamenán u kukuřice (Riccardi *et al.* 1998), u fazolu nezávisle na genotypu (Zadrazník *et al.* 2013) a u lipnice luční, a to u odolného genotypu bez ohledu na délku stresu, u citlivého genotypu pouze při dlouhodobějším působení sucha (Xu *et al.* 2010a). U pšenice byly detekovány dvě izoformy, které na suchu reagovaly opačně (Caruso *et al.* 2009).

Enzymy regenerační fáze Calvinova cyklu

Část dihydroxyacetonfosfátu zůstává v chloroplastech, kde vstupuje do reakcí vedoucích k regeneraci RuBP. Řada reakcí je podobná pentózové dráze. Reakce probíhají bez spotřeby další energie (ATP) nebo redukčních ekvivalentů (NADPH), a účastní se jich enzymy fruktóza-1,6-bisfosfát/sedoheptulóza-1,7-bisfosfátaldoláza (aldoláza), fruktóza-1,6-bisfosfatáza (FBPáza), sedoheptulóza-1,7-bisfosfatáza (SBPáza), transketoláza (TKL), ribulóza-5-fosfát-3-epimeráza (RPE), ribóza-5-fosfátizomeráza (RPI) a fosforibulokináza (PRK). Aldoláza a FBPáza fungují u vyšších rostlin jako homotetramery, SBPáza, TKL, RPE, RPI a PRK jako homodimery. Aktivita FBPázy, SBPázy a PRK jsou regulovány prostřednictvím thioredoxinového systému (Martin *et al.* 2000).

V řadě proteomických studií byly zjištěny významné změny v hladině různých enzymů regenerační fáze Calvinova cyklu v důsledku stresu suchem. Obsah aldolázy při nedostatku vody klesl v listech pšenice (Caruso *et al.* 2009), laskavce (Huerta-Ocampo *et al.* 2009), melounu (Akashi *et al.* 2011) a huseníčku (Skirycz *et al.* 2011), a dále u kultivaru ječmene odolného k suchu (Wendelboe-Nelson *et al.* 2012). V některých případech bylo pozorováno snížení množství tohoto enzymu bez ohledu na citlivost či odolnost rostlin k suchu, a to např. u psinečku (Xu *et al.* 2010b), troskutu (Zhao *et al.* 2011) či blahovičníku (Bedon *et al.* 2012), a bez ohledu na délku trvání sucha rovněž u topolu (Durand *et al.* 2011). Naopak zvýšení hladiny aldolázy během sucha (případně sucha v kombinaci s vysokou teplotou) bylo zaznamenáno u kukuřice (Riccardi *et al.* 1998, Hu *et al.* 2012) a rýže (Salekdeh *et al.* 2002), a to i bez ohledu na intenzitu stresu (Shu *et al.* 2010). U rostlin fazolu došlo při nedostatku vody ke snížení exprese plastidové aldolázy, avšak ke zvýšení množství jiné izoformy aldolázy, a to jak u citlivého, tak u odolného genotypu (Zadrazník *et al.* 2013). Také odolný a citlivý genotyp lipnice luční reagoval na sucho podobným způsobem – snížením hladiny chloroplastové aldolázy, zatímco hladina cytosolické formy tohoto enzymu se naopak zvýšila (Xu *et al.* 2010a). Nárůst množství cytosolické aldolázy byl pozorován také u pšenice (Kang *et al.* 2012).

K poklesu hladiny FBPázy došlo v důsledku sucha u rostlin pšenice (Kang *et al.* 2012), stejně tak tomu bylo u rýže (Shu *et al.* 2011). Pokles obsahu SBPázy byl v důsledku sucha popsán u vojtěšky (Aranjuelo *et al.* 2011), u odolného i citlivého genotypu lipnice luční (Xu *et al.* 2010a), troskutu prstnatého (Zhao *et al.* 2011) a psinečku výběžkatého (Xu *et al.* 2010b), a dále u dubu letního (Sergeant *et al.* 2011). Zvýšená exprese tohoto proteinu naopak nastala u suchem stresovaných rostlin vinné révy (Cramer *et al.* 2013) a trávy druhu *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011).

Obsah enzymu TKL se snížil při stresu suchem u druhu *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011), u citlivého i odolného genotypu ječmene (Ashoub *et al.* 2012), u fazolu (také nezávisle na odolnosti genotypu) (Zadraznik *et al.* 2013), a dále u rostlin rýže při krátkodobé indukci dehydratace pomocí PEG (Shu *et al.* 2011). Naopak v jiné práci zaměřené na dlouhodobější stres nedostatkem vody, působící na rýži, byla exprese tohoto enzymu u odolného genotypu zvýšená (Ji *et al.* 2012). U rostlin pšenice (Kang *et al.* 2012) a u topolu (Bonhomme *et al.* 2009b) bylo rovněž zaznamenáno zvýšení množství tohoto proteinu v důsledku sucha.

Nárůst obsahu RPE byl vodním deficitem indukován u rostlin melounu (Sanda *et al.* 2011) a u odolného genotypu lipnice luční vystaveného krátkodobému stresu suchem (Xu *et al.* 2010a), opačný vliv měl stres suchem na obsah tohoto enzymu v listech vojtěšky (Aranjuelo *et al.* 2011) a fazolu, a to jak u odolného, tak u citlivého genotypu (Zadraznik *et al.* 2013).

Expresí PRK byla u rostlin účinkem sucha spíše snižována. Nižší hladinu v porovnání s kontrolou bylo možné pozorovat u pšenice (Caruso *et al.* 2009), ječmene (Ghabooli *et al.* 2013), psinečku (Merewitz *et al.* 2011), u kukuřice vystavené suchu v kombinaci s vysokou ozářeností (Hu *et al.* 2012), vojtěšky (Aranjuelo *et al.* 2011), huseníčku (Skirycz *et al.* 2011), a dále při dlouhodobém stresu u dubu letního (Sergeant *et al.* 2011). U odolného genotypu lipnice luční obsah tohoto enzymu klesl pouze při dlouhodobějším působení sucha, zatímco u citlivého genotypu i při krátkodobějším stresu (Xu *et al.* 2010a). Zvýšení množství tohoto enzymu v podmínkách vodního deficitu bylo naopak pozorováno u bavlníku (Deeba *et al.* 2012), v jiné práci dělané na kukuřici (Riccardi *et al.* 1998), a u druhu *Sporobolus stapfianus* (Oliver *et al.* 2011).

Enzymy fixace CO₂ u C4 rostlin

Primární fixace CO₂ enzymem Rubisco je typickým rysem fotosyntézy rostlin typu C3. Výrazně odlišný způsob fotosyntetické fixace CO₂ se vyskytuje u některých jiných rostlinných druhů. Zde dochází k vazbě HCO₃⁻ na fosfoenolpyruvát enzymem PEPC za vzniku oxalacetátu, tedy čtyřuhlíkaté sloučeniny, a proto se tyto rostliny označují jako C4. U C4 rostlin je CO₂ fixován vlastně dvakrát – primárně a sekundárně. Atmosferický CO₂ je nejprve fixován v buňkách mezofylu, a to v cytosolu pomocí PEPC. Vzniklý oxalacetát se mění na malát nebo aspartát (podle druhu rostliny) a pak je transportován do buněk pochev cévních svazků. Zde je dekarboxylací uvolněn CO₂ a znovu fixován, tentokrát Calvinovým cyklem. U nejčastějšího typu C4 metabolismu, který má např. kukuřice, čirok či cukrová třtina, působí v první fázi fixace kromě PEPC další specifické enzymy, jako NADP-malátdehydrogenáza (NADP-MDH), jablečný enzym (NADP-ME) a pyruvát, fosfát dikináza (PPDK) (Furbank *et al.* 2000).

Z prací zabývajících se analýzou listového proteomu v souvislosti s vodním deficitem bylo na C4 rostliny (kukuřice, cukrová třtina) zaměřeno jen několik a změny v množství příslušných enzymů byly detekovány pouze u kukuřice. Hu *et al.* (2012) např. pozorovali při dehydrataci zvýšení hladiny NADP-ME a Riccardi *et al.* (2004) nárůst obsahu NADP-MDH.

Karbonátdehydratáza

U rostlin se během fotosyntézy uplatňuje i enzym karbonátdehydratáza (dříve anhydráza kyseliny uhličitě; CA), která pomáhá zvyšovat koncentraci CO₂ uvnitř chloroplastů, čímž se zvyšuje rychlost karboxylace enzymem Rubisco. CA katalyzuje přeměnu H₂CO₃ na CO₂ a vodu a naopak, podílí se tedy jak na fixaci CO₂ během fotosyntézy, tak na respiraci (Coleman 2000).

Množství CA v důsledku sucha v některých případech narostlo, např. u topolu (Durand *et al.* 2011), psinečku výběžkatého (Merewitz *et al.* 2011, Xu *et al.* 2010b), či citlivého genotypu podzemnice olejné (Kottapalli *et al.* 2009). V jiných případech naopak klesalo, např. u melounu (Akashi *et al.* 2011), při dlouhodobějším stresu suchem u dubu letního (Sergeant *et al.* 2011), nebo u huseníčku (Skirycz *et al.* 2011). Opačné reakce různých izoform CA byly pozorovány u pšenice při postupném vysychání substrátu, v němž byly rostliny pěstovány (Caruso *et al.* 2009), a u sóji při

simulaci dehydratace pomocí PEG (Mohammadi *et al.* 2012a). Při desetidenním stresu suchem došlo u odolného genotypu lipnice k nárůstu obsahu dvou izoform CA a u citlivého genotypu navíc k mírnému snížení obsahu další izoformy tohoto enzymu. Pokud bylo sucho prodlouženo ještě o pět dnů, došlo ke zvýšené expresi všech tří izoform (Xu *et al.* 2010a). Zadražník *et al.* (2013) u genotypu fazolu odolného k suchu zaznamenali opačnou reakci dvou izoform CA, zatímco u citlivého genotypu popsali pokles množství pouze jedné izoformy.

Z uvedeného přehledu proteomických studií, jejichž autoři našli změny v obsahu fotosyntetických proteinů u rostlin stresovaných nedostatkem vody, jasně vyplývá značná nesourodost výsledků. V podstatě pro všechny fotosyntetické proteiny platí, že některé práce popisují nárůst jejich množství v listech v důsledku sucha, jiné pokles, a to často i v rámci stejného rostlinného druhu. Totéž lze v řadě případů prohlásit i o dalších proteinech, např. antioxidantních enzymech, ribozomálních podjednotkách a dalších složkách proteosyntetického aparátu, proteinech podílejících se na proolýze aj. Lze předpokládat, že tato nesourodost je důsledkem jednak mezidruhové odlišnosti, jednak rozdílů v intenzitě/délce/způsobu navození stresu suchem, který byl v jednotlivých studiích použit, a pravděpodobně i přesností použitých metod separace či kvantifikace proteinů. Ani při srovnávání genotypů citlivých a odolných k suchu zde zatím většinou nelze nalézt žádný jednoznačný trend a bude nepochybně třeba ještě mnoha dalších studií tohoto typu, než se ukáže, zda změny v množství různých proteinů skutečně mohou souviset nebo být přímo příčinou odolnosti rostlin k vodnímu deficitu.

3. Materiál a metody

3.1. Pokusný materiál, organizace pokusů a podmínky pěstování rostlin

Jako pokusný materiál byla zvolena kukuřice (*Zea mays* L.). Veškerý semenný materiál inbredních rodičovských linií i jejich kříženců F1 generace pocházel z firmy CEZEA – šlechtitelská stanice, a.s., v Čejči (Česká republika) a byl součástí jejího šlechtitelského programu. Rostliny byly pěstovány v květináčích (průměr 12 cm, hloubka 13 cm, vždy 1 rostlina na květináč) naplněných směsí zahradnického substrátu a písku (2:1 v:v). Květináče byly umístěny na parapetních stolech (výška 90 cm od podlahy) ve skleníku na Brožkově genetické zahradě, patřící ke katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (54°04' severní šířky, 14°25' východní délky, nadmořská výška 238 metrů).

Experimenty popsané v této práci lze rozčlenit do pěti hlavních celků, podle kterých je uspořádána i výsledková část práce. Jejich hlavní parametry shrnuje **Tab. 2**. Většina hlavních pokusných celků probíhala nejméně ve dvou samostatných pokusných sezónách. Pokusy byly realizovány v letech 2007 až 2014, a to vždy na jaře. Základní podmínky ve skleníku (teplota a relativní vlhkost vzduchu) byly zaznamenávány po celou dobu pěstování rostlin pomocí automatických záznamníků *Testo 175 T-1* (*Testo, Česká republika*). Osvětlení ve skleníku bylo přirozené, rostliny nebyly nijak uměle přihnojovány a až do začátku příslušné periody sucha byly zalévány podle potřeby (volumetrický obsah vody v květináčích, stanovený v hloubce 5 cm pod povrchem substrátu sondou *WET-2 Sensor* s přístrojem *HH2 Moisture Meter* (*Delta-T Devices, Velká Británie*), činil v této době $27,1 \pm 3,4$ %). Sucho bylo simulováno ukončením závlivky a následným přirozeným vysycháním země v květináčích, přičemž rostliny stresované suchem a rostliny kontrolní byly většinou umístěny v oddělených prostorách skleníku. Uspořádání květináčů s rostlinami reprezentujícími jednotlivé genotypy bylo v náhodných blocích; pokud to bylo možné (v závislosti na klíčivosti obilí), rostliny v květináčích na okrajích bloků nebyly pro pokusy používány. Při zahájení periody sucha měly všechny rostliny tři plně vyvinuté listy (počítáno od báze) a jejich čtvrtý list (na kterém pak byla prováděna většina měření a odběrů vzorků) byl obvykle již viditelný nejméně ze tří čtvrtin své konečné délky. Počet dnů, který byl potřebný pro to, aby rostliny dosáhly vývojového stádia V3, se v jednotlivých letech mírně lišil a pohyboval se mezi 32 a 34 dny.

V prvním experimentálním celku jsem se věnovala možnosti využití vybraných fotosyntetických (a morfologických) charakteristik, měřených u pěti rodičovských inbredních linií kukuřice, pro případnou predikci reakce jejich F1 kříženců na stres suchem, a analýze genetických efektů uplatňujících se v dědičnosti těchto charakteristik. Tyto experimenty se složením analyzovaných genotypů, podmínkami pěstování rostlin a měřeními charakteristikami poněkud více lišily od ostatních částí práce. Genotypy hodnocené v tomto pokusném celku byly vybrané na základě našich předchozích pokusů, v nichž byly podobné analýzy prováděny u rostlin stresovaných chladem či hypoxií spojenou se zaplavením (Holá *et al.* 2003, 2007, Kholová 2006, Kočová *et al.* 2009), a na základě naší první předběžné studie na rostlinách stresovaných suchem (Ždánková 2003). Naneštěstí však tři z pěti rodičovských linií analyzovaných během tohoto experimentálního celku (tudiž i jejich kříženci) byly mezitím vyřazeny ze šlechtitelského programu CEZEA, a.s., a semenný materiál již pro další experimenty nebylo možné získat. Rostliny byly navíc v těchto pokusech pěstovány v období duben až květen a toto období se ukázalo jako nevhodné, protože zejména k jeho konci (tj. v době, kdy probíhala hlavní měření) na rostliny již výrazně působil nejen vliv sucha, ale i vliv zvýšené teploty. Abych se tomu pro budoucnost vyhnula, rozhodla jsem se období pěstování rostlin posunout cca o měsíc zpět. Navíc v té době ještě nebyly k dispozici přístroje na měření OJIP části křivky indukce fluorescence Chl a indexů spektrální odrazivosti, takže soubor hodnocených fotosyntetických charakteristik byl mnohem užší. Nicméně se domnívám, že i tak mají výsledky získané v této části práce zajímavou výpovědní hodnotu.

Tab. 2. Hlavní parametry experimentálních celků popsaných v této práci.

| Experimentální celek / zaměření pokusů | Hodnocené genotypy* | Podmínky pěstování pokusných rostlin** | Skupiny měřených parametrů ⁺ | Metody analýzy výsledků ⁺⁺ |
|---|---|---|--|---|
| Experimentální celek 1 Využití vybraných fotosyntetických a morfologických charakteristik pro predikci reakce na suchu u potomků na základě reakce jejich rodičů. Analýza genetických efektů uplatňujících se v dědičnosti těchto charakteristik. | Soubor 5 inbredních linií (2013, 2023, 2086, CE704, CE810) a 10 jejich kříženců F1 generace (2013×CE704, 2013×CE810, 2023×2086, 2023×CE704, 2086×2023, CE704×2013, CE704×2023, CE704×CE810, CE810×2013, CE810×CE704) | <i>T</i> : 28,2±3,9/18,7±1,5 °C; <i>RH</i> : 41,8±6,0/55,0±4,5 % <i>STÁŘÍ</i> : 32 dnů <i>SUCHO</i> : 6 dnů (silný stres; <i>zřejmě došlo ke</i> <i>kombinaci stresu suchem</i> <i>a vysokou teplotou</i>) | FT, PIGM, GAZ, MORF, RWC | ANOVA2, PHT, KOR, GA |
| Experimentální celek 2 Určení časového průběhu stresové odpovědi a výběr nejvhodnější délky stresové periody pro další pokusy. | Inbrední linie 2023 | <i>T</i> : 24,5±3,1/17,9±1,0 °C; <i>RH</i> : 51,0±8,7/64,6±6,0 % <i>STÁŘÍ</i> : 34 dnů <i>SUCHO</i> : 0 – 10 dnů (mírný až středně silný stres) | OJIP, ISO, PIGM, GAZ, MORF, RWC | ANOVA1 |
| Experimentální celek 3 Určení indexů stresové tolerance a výběr dvou kontrastních genotypů pro další analýzy. Využití vybraných fotosyntetických charakteristik pro screening na odolnost k suchu. | Soubor 25 inbredních linií (2017, 2022, 2023, 2030, 2087, 2121, 2124, 2126, 2187, 2232, 2404, 2412, 2472, 2509, 2550, 2608, 2629, 2630, 2638, CE704, CE7010, CE7011, CE7032, CE7037, CE60018) | <i>T</i> : 25,4±2,4/19,8±0,7 °C; <i>RH</i> : 55,8±6,8/65,4±4,4 % <i>STÁŘÍ</i> : 33 dnů <i>SUCHO</i> : 6 a 10 dnů (mírný a středně silný stres) | OJIP, ISO, GAZ, MORF (<i>vybrané</i> <i>parametry</i>) | ANOVA2, KOR, ICOS |
| Experimentální celek 4 Detailní rozbor reakce vybraných fotosyntetických a morfologických charakteristik a listového proteomu na sucho – rozdíl mezi genotypem citlivým a odolným k suchu. | Inbrední linie 2023 a CE704 | <i>T</i> : 26,2±2,8/19,3±0,7 °C; <i>RH</i> : 56,0±5,8/63,2±2,8 % <i>STÁŘÍ</i> : 32 dnů <i>SUCHO</i> : 6 dnů (mírný stres) | OJIP, FAIC, ISO, PIGM, GAZ, MORF, RWC, 2-DGE, iTRAQ | ANOVA1, PHT |
| Experimentální celek 5 Detailní rozbor reakce vybraných fotosyntetických a morfologických charakteristik a listového proteomu na sucho – rozdíl mezi genotypem citlivým a odolným k suchu a mezi rodiči a F1 kříženci. | Inbrední linie 2023 a CE704, jejich kříženci F1 generace 2023×CE704, CE704×2023 | <i>T</i> : 26,2±2,4/19,2±0,7 °C; <i>RH</i> : 57,0±5,5/65,3±3,6 % <i>STÁŘÍ</i> : 32 dnů <i>SUCHO</i> : 10 dnů (středně silný stres) | OJIP, FAIC, ISO, PIGM, GAZ, MORF, RWC, iTRAQ | ANOVA1, PHT |

* v případě kříženců je mateřský genotyp uveden vždy jako první

** *T*, resp. *RH* ... průměrná teplota, resp. průměrná relativní vlhkost vzduchu ve skleníku ve dne/v noci (za den je považováno období 8:00-19:00 letního středoevropského času) během pěstování pokusných rostlin; *STÁŘÍ* ... stáří rostlin na začátku periody sucha (den výsevu je počítán jako den 0); *SUCHO* ... délka periody sucha, které byly pokusné rostliny vystaveny (s uvedením předpokládané intenzity stresu)

⁺ **2-DGE** ... analýza listového proteomu pomocí 2-DGE; **FAIC** ... fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů; **FT** ... základní parametry fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaných listů (F_0 , F_m , F_v , F_v/F_m); **GAZ** ... charakteristiky výměny plynů; **ISO** ... indexy spektrální odrazivosti; **iTRAQ** ... analýza listového proteomu pomocí iTRAQ značení; **MORF** ... charakteristiky popisující výšku rostlin, stav a rozměry jednotlivých listů, počet listů, hmotnost suché (někdy i čerstvé) biomasy nadzemní části a kořenů; **OJIP** ... parametry (a křivky relativní variabilní fluorescence a diferenční kinetiky) odvozené z rychlé části křivky indukce fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaných listů; **PIGM** ... obsahy a poměry fotosyntetických pigmentů; **RWC** ... relativní obsah vody v listu

⁺⁺ **ANOVA1**, resp. **ANOVA2** ... analýza variance jednoduchého, resp. dvojného třídění s interakcemi; **ICOS** ... výpočet indexů citlivosti/odolnosti k suchu; **GA** ... kvantitativně genetická analýza; **KOR** ... korelace mezi jednotlivými charakteristikami nebo mezi genotypy; **PHT** ... *post-hoc* testy rozdílů mezi jednotlivými variantami

Ve všech dalších pokusech byly rostliny pěstovány v období březen až duben a měření byla většinou prováděna v druhé polovině dubna. V druhé části práce byl v těchto nových podmínkách pěstování hodnocen u náhodně zvolené inbrední linie časový průběh stresové odpovědi (0-10 dnů bez zalévání) a na základě těchto výsledků byla vybrána nejvhodnější délka stresové periody pro další experimenty. Třetí experimentální celek představoval výběr vhodných kontrastních genotypů z širšího souboru 25 inbredních linií kukuřice (nový soubor poskytnutý šlechtitelskou stanicí CEZEA, a.s.), a to na základě jejich odolnosti/citlivosti k suchu určené pomocí dvou indexů stresové tolerance. V této části byla zároveň hodnocena i vhodnost vybraných fotosyntetických parametrů pro screening na odolnost k suchu. Ve čtvrtém oddíle jsem se věnovala detailnímu rozboru reakce na suchu u dvou takto vybraných inbredních linií, a to včetně analýzy listového proteomu. A konečně pátá část práce již byla zaměřena nejen na analýzu obou kontrastních inbredních linií, ale opět i jejich kříženců F1 generace, a její součástí byla také analýza listového proteomu.

3.2. Metody

Veškerá měření a odběry vzorků probíhaly vždy v době mezi 8:00 a 11:00 letního středoevropského času, pouze při stanovení hmotností čerstvé a suché biomasy byly rostliny zpracovány vždy až po skončení všech ostatních měření v příslušném dnu (většinou mezi 12:00 a 14:00). Počet biologických opakování u každé pokusné varianty (genotyp/pěstování) závisel na měřené charakteristice a pokusném celku a pohyboval se většinou od 4 do 20 (konkrétní počty jsou uvedeny ve výsledkové části práce). Ve všech případech (s výjimkou měření fotochemických aktivit izolovaných chloroplastů a přípravy vzorků pro proteomické analýzy, kdy byl jeden vzorek připravován vždy ze směsi listů z více pokusných rostlin) představovalo jedno opakování vždy jednu samostatnou rostlinu.

3.2.1. Morfologie a vývoj rostlin

Vývoj rostlin byl sledován průběžně během celého pěstování. Za dosažení určitého vývojového stádia byla považována doba, kdy alespoň 80 % rostlin příslušné varianty mělo příslušný list plně vyvinutý (tj. byl vidět jeho jazýček).

U jednotlivých rostlin byla v hlavních pokusných dnech (tj. na počátku periody sucha a po jejím skončení; v případě druhého experimentálního celku i v jejím průběhu vždy v dvoudenních intervalech) měřena celková výška rostlin (měřeno jednak od úrovně substrátu v květináči k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu – LDH, jednak od úrovně substrátu v květináči ke špičce listu viditelného ve vrcholové růžici – LWH), dále také výška nasazení jednotlivých plně dorostlých listů (a z toho byla dopočítána délka jednotlivých internodií). Sledován byl rovněž počet všech plně vyvinutých listů (LDN), počet viditelných listů (LVN) a vzhled listů (barva, celkový stav). Rozlišováno bylo celkem devět kategorií stavu listu (**Tab. 3**).

Tab. 3. Použité kategorie popisující stav jednotlivých listů kukuřice

| Kategorie | Popis stavu listu |
|-----------|---|
| 1 | List je po celé délce zelený |
| 2 | Špička listu (maximálně 1/4 celkové délky) začíná žloutnout, zbytek listu je zelený |
| 3 | Špička listu (maximálně 1/4 celkové délky) je uschlá, zbytek listu je zelený |
| 4 | List je cca z 1/3 (od vrcholu) žlutý, zbytek listu je zelený |
| 5 | List je cca z 1/3 (od vrcholu) suchý, zbytek listu je zelený |
| 6 | List je cca z 1/2 suchý až žlutý, zbytek listu je zelený |
| 7 | List je po celé délce žlutý |
| 8 | List je cca z 1/2 suchý, zbytek listu je žlutý |
| 9 | List je po celé délce suchý |

U rostlin hodnocených ve druhém, čtvrtém a pátém experimentálním celku byla měřena také délka a střední (největší) šířka jednotlivých listů a z toho byla dopočítána plocha listů (LA) a celková plocha všech alespoň částečně fotosyntetizujících listů (TLA). Pro výpočet plochy listů byl použit následující vzorec:

$$LA=D \times \bar{S} \times KPL$$

kde D je délka listu, \bar{S} je střední šířka listu a KPL je koeficient, který byl pro jednotlivé listy a jednotlivé genotypy určen na základě gravimetrického stanovení plochy listů metodou vážení kopií listů (Šesták *et* Čatský 1966) v samostatném experimentu, kdy byla plocha listu vyhodnocena u 50 rostlin od každého genotypu. Hodnoty těchto koeficientů jsou uvedeny v **Tab. 4**. Ve čtvrtém a pátém pokusném celku byly při výpočtu TLA pro zpřesnění zahrnuty i ty listy, které ještě nebyly plně vyvinuté; v takových případech byla vzata v úvahu délka a šířka viditelné části listu a výpočet byl příslušně modifikován. Za alespoň částečně fotosyntetizující listy byly považovány ty, které byly alespoň z poloviny zelené (kategorie 1-6, **Tab. 3**).

Tab. 4. Koeficienty pro výpočet plochy jednotlivých listů u inbredních linií kukuřice 2023 a CE704 a jejich kříženců F1 generace, vypočítané na základě gravimetrického stanovení plochy listů u 50 rostlin od každého genotypu.

| Genotyp | List 1 | List 2 | List 3 | List 4 | List 5 | List 6 | List 7 | List 8 |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 2023 | 0,78 | 0,79 | 0,75 | 0,70 | 0,70 | 0,69 | 0,71 | 0,73 |
| CE704 | 0,76 | 0,78 | 0,75 | 0,73 | 0,72 | 0,72 | 0,73 | 0,72 |
| 2023×CE704 | 0,75 | 0,79 | 0,83 | 0,73 | 0,74 | 0,73 | 0,73 | 0,74 |
| CE704×2023 | 0,77 | 0,76 | 0,78 | 0,71 | 0,72 | 0,68 | 0,76 | 0,74 |

Specifická hmotnost listu (SLW) byla stanovena opět v hlavních pokusných dnech, vždy ze čtvrtého listu. Ze střední části listové čepele bylo kruhovým razidlem o průměru 8 mm vyseknuto deset terčů, které byly špendlíkem připíchnuty na polystyrénovou destičku, umístěny do sušárny (*UM 500, Memmert, Německo*) a sušeny při 80 °C po dobu tří dnů. Po jejich vysušení do konstantní hmotnosti byly zváženy na mikrováhách (*Sartorius 4401, Sartorius, Německo*) s přesností 0,001 mg, zjištěná hmotnost sušiny byla přepočítána na jednotku plochy listu.

V hlavních pokusných dnech byla také stanovena hmotnost suché biomasy nadzemní části rostliny (DMS) a kořenů (DMR), případně jejich součet (DMT). Rostliny byly opatrně vyjmuty z květináčů, kořeny byly pod proudem vody pečlivě očištěny od zbytků substrátu a odděleny od nadzemní části. Obě části rostliny byly po krátkém oschnutí na vzduchu vloženy do papírových sáčků a umístěny do sušárny, kde byly sušeny při 80 °C po dobu nejméně jednoho týdne. Po jejich vysušení do konstantní hmotnosti byly zváženy na analytických vahách (*XT 120A, Precisa Gravimetrics, Švýcarsko*) s přesností 0,1 mg (stanovení DM). V některých pokusech byla stanovena i hmotnost suché biomasy jednotlivých listů (DML).

3.2.2. Relativní obsah vody v listu

Ze střední části listové čepele čtvrtých listů byly vystříženy kousky listu o ploše cca 1-2 cm² a ihned zváženy na analytických vahách, čímž byla získána tzv. „čerstvá hmotnost“ (FW). Poté byly vloženy do zkumavek s vodou a ponechány pět hodin ve tmě při pokojové teplotě. Po této době byly vyndány, jemně osušeny kouskem gázy a opět zváženy na analytických vahách („nasycená hmotnost“, SW). Následovalo jejich připíchnutí na polystyrénovou destičku a umístění do sušárny na dva dny, kdy byly sušeny při 80 °C. Po vysušení do konstantní hmotnosti byly zváženy na mikrováhách („suchá hmotnost“, DW). Ze získaných hodnot byl vypočítán relativní obsah vody v listu (RWC) podle vzorce:

$$RWC=100 \times [(FW-DW)/(SW-DW)]$$

3.2.3. Výměna plynů mezi listem a vnějším prostředím

Charakteristiky výměny plynů mezi rostlinou a vnějším prostředím (P_N , E a g_s) byly měřeny *in situ* na svrchní straně čtvrtého listu pokusných rostlin pomocí infračerveného analyzátoru *LCpro+* (*ADC BioScientific, Velká Británie*). Parametry nastavené při měření v přístroji byly následující: ozáření 650 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR, teplota v měřicí komůrce 25 °C, koncentrace CO_2 550±50 $\text{cm}^3 \text{m}^{-3}$, rychlost proudění vzduchu 205±30 $\mu\text{mol s}^{-1}$. Délka měření každého vzorku byla 10 minut poté, co se v měřicí komůrce ustanovily rovnovážné podmínky. Výsledky z těchto měření jsou v práci uvedeny se souhlasem ing. Františka Hniličky, Ph.D., a ing. Heleny Hniličkové, Ph.D., z České zemědělské univerzity v Praze (Fakulta agronomie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra botaniky a

fyzologie rostlin), kteří měření prováděli; zpracování a interpretace výsledků jsou mým vlastním dílem. Z naměřených hodnot byla vypočítána také „okamžitá“ efektivita využití vody $WUE = P_N/E$ a „vnitřní“ efektivita využití vody $WUE_i = P_N/g_s$.

3.2.4. Obsahy a poměry fotosyntetických pigmentů

Ze střední části čepele čtvrtého listu pokusných rostlin byly vyseknuty čtyři kruhové terčíky o průměru 8 mm, vloženy do skleněných zkumavek a přelity 10 ml N,N-dimetylformamidu (DMF). Zkumavky byly překryty parafilmem a alobalem a umístěny do lednice, kde byly přechovávány po dobu 5-7 dnů (za občasného promíchání vzorků na laboratorní třepače). Po této extrakci byl obsah fotosyntetických pigmentů, tj. Chl *a*, Chl *b* a Kar, určen spektrofotometricky (*Anthelie Advanced 2*, *Secomam*, *Francie*) na základě stanovení absorbance (*ABS*) vzorků při vlnových délkách 480 nm (*ABS*₄₈₀), 647 nm (*ABS*₆₄₇), 664 nm (*ABS*₆₆₄) a 710 nm (*ABS*₇₁₀). Obsahy fotosyntetických pigmentů byly počítány podle následujících vzorců (Wellburn 1994):

$$\begin{aligned} \text{Chl } a &= 11,65 \times (\text{ABS}_{664} - \text{ABS}_{710}) - 2,69 \times (\text{ABS}_{647} - \text{ABS}_{710}) \\ \text{Chl } b &= 20,81 \times (\text{ABS}_{647} - \text{ABS}_{710}) - 4,53 \times (\text{ABS}_{664} - \text{ABS}_{710}) \\ \text{Kar} &= [1000 \times (\text{ABS}_{480} - \text{ABS}_{710}) - 0,89 \times \text{Chl } a - 52,02 \times \text{Chl } b] / 245 \end{aligned}$$

a následně vynásobeny 10 (vzhledem k použitému objemu DMF) a přepočteny na jednotku listové plochy. Pro vyjádření obsahu pigmentů na jednotku sušiny byly použity hodnoty SLW.

3.2.5. Indexy spektrální odrazivosti

Indexy NDVI (Rouse *et al.* 1974) a PRI (Gamon *et al.* 1992) byly měřeny vždy na svrchní straně střední části listové čepele čtvrtého listu pokusných rostlin, a to pomocí přístrojů *PlantPen NDVI 300* a *PlantPen PRI 200* (*Photon System Instruments*, *Česká republika*). Délka pulzu byla v obou případech 2 ms. Byla realizována vždy dvě technická opakování měření těsně za sebou (na odlišných místech listu), která pak byla pro příslušnou rostlinu zprůměrována. Z rozdílů odrazivosti (*R*) dvou monochromatických záření rozdílné vlnové délky (760 a 635 nm v případě NDVI, 570 a 531 nm v případě PRI) od povrchu listu byly hodnoty NDVI a PRI vypočítány podle vzorců:

$$\begin{aligned} \text{NDVI} &= (R_{760} - R_{635}) / (R_{760} + R_{635}) \\ \text{PRI} &= (R_{570} - R_{531}) / (R_{570} + R_{531}) \end{aligned}$$

3.2.6. Fluorescence chlorofylu

V prvním experimentálním celku byly na svrchní straně čtvrtého listu pokusných rostlin (ve střední části listové čepele) měřeny pouze nejzákladnější parametry fluorescence Chl: F_0 a F_m , a to pomocí přístroje *OS30P* (*ADC BioScientific*, *Velká Británie*). Před vlastním měřením byly listy 20 minut temnotně adaptovány pomocí speciálních klipů. Délka SP o vlnové délce 660 nm byla 1 s, intenzita byla 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Fluorescence byla měřena na jednom listu vždy dvakrát těsně za sebou (na odlišných místech listu) a obě tato technická opakování byla pro příslušnou rostlinu zprůměrována. Maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII byl vypočítán jako $(F_m - F_0) / F_m$.

Pro měření fluorescence Chl ve všech dalších experimentálních blocích byl použit přístroj *FluorPen FP100max* (*Photon System Instruments*, *Česká republika*), pracující se zářením o vlnové délce 455 nm, použitá intenzita saturačního pulzu byla 3000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, délka opět 1 s. Měřen byl vždy nejprve parametr Q_Y , počítaný jako $(F'_m - F'_0) / F'_m$, kde příslušné hodnoty fluorescence byly změřeny na světelně adaptovaných listech, a použity byly opět průměry ze dvou technických opakování na jednom listu. Uvedený přístroj umožnil provést také detailní analýzu rychlé fáze křivky kinetiky indukce fluorescence Chl (OJIP analýzu). Hodnoty fluorescence byly v tomto případě měřeny u temnotně adaptovaných listů (rostliny byly přeneseny do místnosti bez oken, ponechány zde 20 minut a poté – stále ve tmě – byla změřena fluorescence Chl), a to opět ve střední části listové čepele čtvrtého listu. Fluorescence po excitačním pulzu byla přístrojem zaznamenávána v časovém rozmezí 10 μs až 2 s, přičemž během prvních 600 μs docházelo k záznamu každých 10 μs , poté až do času 14 ms byly hodnoty zaznamenávány každých 100 μs , do času 90 ms byl jeden záznam každou 1 ms a ve

zbytku doby měření byl interval mezi jednotlivými záznamy 10 ms. Hodnoty fluorescence v časech 50 μ s (F_0), 300 μ s (F_K), 2 ms (F_J), 60 ms (F_I), a $F_M \approx F_P$ (maximální intenzita fluorescence) byly použity pro výpočty různých parametrů podle Strasser *et al.* (2000, 2004) a Stirbet *et al.* Govindjee (2011). Přehled těchto parametrů, vzorce pro jejich výpočet a jejich biologický význam shrnuje **Tab. 5**.

Tab. 5. Vybrané fotosyntetické parametry JIP testu, vypočítané na základě hodnot fluorescence chlorofylu v časech 40 μ s (F_0), 300 μ s (F_K), 2 ms (F_J), 30 ms (F_I) a maximální fluorescence (F_m), naměřených během rychlé fáze fluorescenčního přechodového jevu (OJIP). PS ... fotosystém, RC ... reakční centrum.

| Parametr | Biologický význam | Vzorec pro výpočet |
|----------------|--|--|
| V_J | Relativní variabilní fluorescence v bodě J | $(F_J - F_0)/(F_m - F_0)$ |
| V_I | Relativní variabilní fluorescence v bodě I | $(F_I - F_0)/(F_m - F_0)$ |
| M_0 | Přibližný počáteční sklon OJIP křivky fluorescenčního přechodového jevu | $4 \times (F_K - F_0)/(F_m - F_0)$ |
| Φ_{P0} | Maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII | $(F_m - F_0)/F_m$ |
| Φ_{E0} | Kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B | $[1 - (F_0/F_m)] \times \Psi_{E0}$ |
| Φ_{RE0} | Kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI | $1 - (F_I/F_m)$ |
| Φ_{D0} | Kvantový výtěžek disipace zachycené energie | F_0/F_m |
| Ψ_{E0} | Účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B | $1 - V_J$ |
| Ψ_{RE0} | Účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI | $1 - V_I$ |
| δ_{RE0} | Účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI | $(1 - V_I)/(1 - V_J)$ |
| γ_{RC} | Pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako RC | $1/(ABS/RC + 1)$ |
| ABS/RC | Průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno PSII RC (zdánlivá velikost světlosběrné antény aktivního PSII) | $(M_0/V_J) \times (1/\Phi_{P0})$ |
| TP_0/RC | Maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno PSII RC | M_0/V_J |
| ET_0/RC | Tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno PSII RC | $(M_0/V_J) \times \Psi_{E0}$ |
| RE_0/RC | Tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno PSII RC | $(M_0/V_J) \times \Psi_{RE0}$ |
| DI_0/RC | Tok disipované energie vyjádřený na jedno PSII RC | $(ABS/RC) - (TP_0/RC)$ |
| PI_{ABS} | Performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q_B | $[1/(ABS/RC)] \times [\Phi_{P0}/(1 - \Phi_{P0})] \times [\Psi_{E0}/(1 - \Psi_{E0})]$ |
| PI_{TOTAL} | Performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI | $PI_{ABS} \times [\delta_{RE0}/(1 - \delta_{RE0})]$ |

Kromě parametrů JIP testu byl celý záznam průběhu indukce fluorescence Chl v různých částech OJIP křivky normalizován přepočítáním na tzv. relativní variabilní fluorescence (W) podle Yusuf *et al.* (2010), aby se získaly další informace o primárních fotosyntetických procesech probíhajících v listech pokusných rostlin. Počítány a graficky vyjádřeny byly průběhy následujících relativních variabilních fluorescencí:

$$\begin{aligned}
 W_{OI} &= (F_t - F_0)/(F_I - F_0) \\
 W_{OJ} &= (F_t - F_0)/(F_J - F_0) \\
 W_{OK} &= (F_t - F_0)/(F_K - F_0) \\
 W_{IP} &= (F_t - F_I)/(F_P - F_I)
 \end{aligned}$$

kde F_t představuje intenzitu fluorescence v jednotlivých časových bodech záznamu. Dále byly vypočítány a sestaveny také tzv. křivky diferenční kinetiky (ΔW), které umožnily přímo srovnat

kontrolní a stresované rostliny a zobrazit tzv. K a L pásy OJIP křivky, jak je uvedeno v Yusuf *et al.* (2010). Průběh těchto křivek byl počítán podle vzorců:

$$\begin{aligned}\Delta W_{OI} &= (W_{OI \text{ Stres}} - W_{OI \text{ Kontrola}}) \\ \Delta W_{OJ} &= (W_{OJ \text{ Stres}} - W_{OJ \text{ Kontrola}}) \\ \Delta W_{OK} &= (W_{OK \text{ Stres}} - W_{OK \text{ Kontrola}})\end{aligned}$$

3.2.7. Fotochemické aktivity izolovaných chloroplastů

Vzorky izolovaných chloroplastů pro měření aktivit PSI, PSII a celého elektron-transportního řetězce (WETC) byly připraveny jako směsné vzorky vždy z osmi rostlin reprezentujících příslušnou variantu. Použita byla opět střední část čepele čtvrtého listu. Z listů byly nejprve vyseknuty kruhové terčíky o průměru 5 mm, které byly použity pro stanovení hodnot SLW a obsahu celkového Chl vyjádřeného na jednotku plochy listu přímo pro vzorek listů, z nichž byly fotochemicky aktivní chloroplasty izolovány. Jednalo se tedy o samostatné vzorky nesouvisející se stanovením obsahu fotosyntetických pigmentů a SLW uvedeným v kap. 3.2.1 a 3.2.4 (způsob stanovení těchto charakteristik byl ovšem obdobný) a sloužící pouze pro přepočty fotochemických aktivit chloroplastů na jednotku listové plochy a jednotku sušiny (viz dále). Pro každou variantu (genotyp/pěstování) byly takto připraveny tři vzorky (technická opakování) pro stanovení obsahu Chl a tři vzorky pro stanovení SLW, přičemž každý vzorek obsahoval čtyři terčíky.

Ze zbytku listu byla odstraněna špička, báze a střední žebro a poté byla čepel nastříhávána na malé kousky o celkové hmotnosti přibližně 2,5-3 g. Tyto kousky byly vloženy do 40 ml předchlazeného (0-4 °C) izolačního média (0,4 M sacharóza, 50 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0) a homogenizovány po dobu 18 s na homogenizátoru *OV5 (Velp Scientifica, Itálie)* s *VSS2CCR2* dispergačním nástavcem při otáčkách 15000 rpm. Homogenát byl přefiltrován přes 8 vrstev gázy a centrifugován (*Universal 320R, Hettich, Německo*) při 1000×g a teplotě 0 °C po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován tyčinkou obalenou vatou v 0,8-1,2 ml předchlazeného (0-4 °C) resuspendačního média (0,4 M sacharóza, 6 mM MgCl₂, 40% glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0). Získané suspenze izolovaných mezofylových chloroplastů (odpovídající chloroplastům II. třídy, typ C podle nomenklatury uvedené v Hall 1972) byly udržovány při teplotě 0-4 °C a ve tmě až do měření aktivit PSI, PSII a WETC (dřívějšími metodickými pokusy bylo ověřeno, že takto připravené chloroplasty si udrží svoji aktivitu nejméně po dobu 8 hod).

Koncentrace celkového Chl v suspenzích chloroplastů byla stanovena spektrofotometricky (*Anthelie Advanced 2, Secomam, Francie*) v 80% vodném roztoku acetonu (ředění 1:100 v:v chloroplastová suspenze:aceton), a to na základě stanovení absorbance vzorků při vlnových délkách 645 nm (*ABS₆₄₅*), 663 nm (*ABS₆₆₃*) a 710 nm (*ABS₇₁₀*) (Porra *et al.* 1989). Koncentrace celkového Chl byla vypočítána podle vzorce:

$$Chl\ a+b=8,02\times(ABS_{663}-ABS_{710})+20,2\times(ABS_{645}-ABS_{710})$$

a upravena na příslušné ředění. Na základě těchto hodnot byl vypočítán objem chloroplastové suspenze potřebný k tomu, aby se do měřicí komůrky dostalo množství vzorku odpovídající 7 μg Chl; vypočtený obsah Chl byl pak použit i při konečném vyjádření fotochemických aktivit chloroplastů.

Aktivity PSII, PSI a WETC byly měřeny v každém pokusném dnu vždy v tomto pořadí, a to polarograficky, kyslíkovou elektrodou Clarkova typu (*Theta' 90, Česká republika*). Všechna měření probíhala ve speciální komůrce o objemu 5 ml, sestavené podle Bartoš *et al.* (1975), přičemž v komůrce byla udržována konstantní teplota 25 °C a reakční směs byla neustále promíchávána magnetickým míchadlem. Na začátku a na konci každého dne měření byl systém zkalibrován: komůrka byla naplněna destilovanou vodou a sycením dusíkem, resp. vzduchem, byl ustálen rovnovážný stav odpovídající nulové, resp. 20,96%, koncentraci kyslíku v komůrce. Reakční směsi (viz dále) byly po přidání chloroplastové suspenze ponechány nejprve minutu ve tmě a poté ozářeny „bílým“ světlem (850 μmol m⁻² s⁻¹), přičemž aktivity PSII a PSI byly odečítány ve druhé až třetí minutě po ozáření a aktivita WETC ve druhé až páté minutě po ozáření. Jednotlivé vzorky byly měřeny vždy nejméně ve dvou, podle potřeby ve třech až čtyřech technických opakováních a výsledné hodnoty byly poté zprůměrovány.

Aktivita PSII byla měřena jako množství kyslíku produkovaného chloroplastovými suspenzemi po jejich ozáření a přidání 2 mM ferrikyanidu draselného spolu s 1 mM 2,6-dimetylbenzochinonem (DMBQ) jako umělých akceptorů elektronů (přirozeným donorem elektronů byla voda). Reakce probíhala v měřicím médiu o složení 0,4 M sacharóza, 50 mM MgCl₂, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0.

Aktivita PSI byla měřena jako množství kyslíku spotřebovaného chloroplastovými suspenzemi po jejich ozáření, jako umělý donor elektronů v tomto případě sloužil 250 μM 2,6-dichlorfenolindofenol (DCPIP) redukovaný 10 mM askorbátem sodným, jako umělý akceptor elektronů sloužil 100 μM metylviologen (MeV) a jako blokátor PSII byla použita 10 μM 3-(3',4'-dichlorfenyl)-1,1-dimethylmočovina (DCMU). Do reakční směsi byl dále přidáván také 5 mM azid sodný k zablokování aktivity endogenních kataláz. Reakce probíhala v reakčním médiu o složení 0,4 M sacharóza a 50 mM NaH₂PO₄ · H₂O (pH 6,5).

Aktivita WETC byla měřena opět jako množství kyslíku spotřebovaného chloroplastovými suspenzemi po jejich ozáření, přičemž 100 μM MeV fungoval jako umělý akceptor elektronů a donorem elektronů byla voda. Reakční médium bylo v tomto případě složeno z 50 mM tricinu a 30 mM NaCl (pH 8,0) a opět byl přidáván i 5 mM azid sodný.

Do všech reakčních směsí buď byl nebo nebyl přidáván také 5 mM NH₄Cl, který slouží k odpražení fotosyntetického elektronového transportu a fotofosforylace; aktivity PSII, PSI i WETC mohly být tudíž měřeny jak ve „spřažené“, tak v „odpražené“ formě. Zásobní roztoky ferrikyanidu draselného, DMBQ (rozpuštěn v 96% ethanolu), MeV a askorbátu sodného byly připravovány čerstvě na začátku každého pokusného dne, ostatní roztoky byly připravovány podle potřeby, vždy však čerstvě v rámci jednotlivých větších pokusných bloků.

Množství kyslíku produkovaného/spotřebovaného chloroplastovými suspenzemi bylo pomocí hodnot zjištěných při kalibraci systému, obsahu Chl v suspenzích a konstanty rozpustnosti kyslíku ve vodě při normálním tlaku a teplotě 25 °C vyjádřeno v přepočtu na jednotkové množství celkového Chl a jednotku času. Z tohoto vyjádření byly poté fotochemické aktivity pomocí obsahu celkového Chl vyjádřené na jednotku plochy listu a SLW přepočítány ještě na jednotku plochy listu a jednotku času, případně jednotku hmotnosti sušiny a jednotku času (Benešová 2006).

3.2.8. Analýza listového proteomu

Tato analýza byla součástí pouze čtvrtého a pátého pokusného celku a tvořila jednu z hlavních náplní celé práce. Během pokusů čtvrtého experimentálního celku byla u dvou rodičovských linií provedena jednak komplexní proteomická analýza pomocí 2-DGE, jednak analýza pomocí iTRAQ. Rozdíly ve výsledcích získaných těmito metodami byly značné a počet proteinů identifikovaných pomocí 2-DGE a vykazujících významné rozdíly mezi experimentálními variantami byl poměrně malý, takže jsem se v rámci pokusů pátého experimentálního celku rozhodla 2-DGE zcela vynechat a soustředila jsem se pouze na iTRAQ analýzu.

Pro proteomickou analýzu byly použity směsné vzorky čtvrtých listů z 10 rostlin reprezentujících každou pokusnou variantu. Listové pletivo bylo homogenizováno v tekutém dusíku a extrahováno 20% kyselinou trichloroctovou v acetonu. Pro 2-DGE analýzu byly celkové proteiny ze sraženiny extrahovány lyzí pomocí roztoku obsahujícího močovinu, dithiothreitol (DTT) a 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylamonio]-1-propansulfonát (CHAPS) podle Görg *et al.* (2000).

Isoelektrická fokusace byla provedena podle návodu výrobce na předpřipravených polyakrylamidových gelových stripech s imobilizovaným pH gradientem (*ReadyStripTM*, BioRad, CA, USA). Pro počáteční experimenty byly použity stripy s širokým rozpětím pH (3-10) k porovnání širokého spektra proteinů. Pro detailnější porovnání byly použity stripy s užším rozpětím pH (4-7). Dále následovala separace proteinů v druhém rozměru pomocí SDS-polyakrylamidové gelové elektroforézy. Od každé varianty (genotyp/pěstování) byla k dispozici tři nezávislá opakování. Gely byly obarveny stříbrem (Blum *et al.* 1987) a jednotlivé varianty byly mezi sebou vizuálně porovnány. Proteiny, ve kterých se vzorky lišily buď v přítomnosti či intenzitě příslušné skvrny na gelu, byly izolovány a analyzovány pomocí MALDI-TOF MS/MS po štěpení trypsinem. Následovala jejich identifikace (identifikace příslušných genů) porovnáním s EST („expressed sequence tags“) a proteinovými databázemi (viz dále).

Analýza vzorků značených iTRAQ byla provedena ve spolupráci s Mgr. Petrem Jedelským z Laboratoře hmotnostní spektrometrie Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Vysušené vzorky obsahující 100 μg celkových proteinů byly rozpuštěny podle instrukcí výrobce (*Applied Biosystems*,

CA, USA) v příslušném pufru, poté redukovány, alkylovány, rozštěpeny trypsinem, označeny 4-plexovými (čtvrtý pokusný celek) nebo 8-plexovými (pátý pokusný celek) iTRAQ značkami a smíchány. Smíchané vzorky byly poté přes noc vysráženy v 500 µl acetonu při -20 °C. Sraženina byla izolována, většina acetonu byla opatrně vylita a zbytek byl ponechán se vypařit po dobu 5 minut. Vzorky byly poté rozpuštěny v 250 µl 2 M močoviny, nality na fokusační táč *Protean IEF Cell* (Bio-Rad, CA, USA) o délce 17 cm a překryty 17 cm IPG stripy (pH 3-10, Bio-Rad, CA, USA) bez papírových tampónů a oleje. Aktivní rehydratace při 50 V po dobu 2 hodin byla následována vystavením napětí 100, 250, 500, 1000 V po dobu 15 minut a maximu 10 kV, dokud nebylo dosaženo 40 kVhodin. Proud byl omezen na 50 µA. Stripy byly nařezány na 2-3 mm široké kousky, které byly sonikovány 15 minut s 20 µl 50% acetonitrilu (ACN) a 0,1% (v:v) kyselinou trifluorooctovou (TFA). Supernatanty byly smíchány s vodou v poměru 1:1 (v:v) a rozděleny nano-RP HPLC.

LC-MALDI analýza byla provedena na *Ultimate 3000* HPLC systému připojeném k sběrači mikrofrakcí *Probot* (Dionex, CA, USA). Extrahované frakce po izoelektrické fokusaci byly nanášeny na *PepMap 100 C18 RP* kolonu (velikost částic 3 µm, délka 15 cm, vnitřní průměr 75 µm; Dionex, CA, USA) a separovány na gradientu 5% (v:v) ACN + 0,1% (v:v) TFA až 80% (v:v) ACN + 0,1% (v:v) TFA po dobu 60 minut. Rychlost průtoku byla nastavena na 300 nl/min. Eluát byl před nanášením na MALDI smíchán v poměru 1:3 s matricovým roztokem 2 mg/ml α -cyano-4-hydroxyskořicové kyseliny v 80% ACN pomocí systému *Probot* (rychlost nanášení byla 5 skvrn za minutu, tj. 60 nl eluátu + 180 nl matricového roztoku na MALDI skvrnu).

Spektra byla získána na analyzátoru *4800 Plus MALDI TOF/TOF* (AB Sciex, MA, USA) vybaveném *Nd:YAG* laserem (355 nm, rychlost 200 Hz). Všechny skvrny byly nejprve proměřeny v MS módu od m/z 800 do m/z 4000 a poté bylo pro MS/MS analýzu vybráno až 15 nejsilnějších prekurzorů z každé skvrny. MS/MS analýza byla provedena s 1 kV kolizní energií a operačním tlakem v kolizní komůrce 10^{-6} Torrů.

Seznamy piků MS/MS spekter byly u 4-plexu vygenerovány pomocí programu *GPS Explorer* v. 3.6 (AB Sciex, MA, USA) a identifikovány lokálně instalovaným programem *Mascot* v. 2.1 (Matrix Science, MA, USA) proti proteinové databázi NCBI (všechny neredundantní GenBank CDS translate + PDB + SwissProt + PIR + PRF) a EST databázi stažené z GenBank. Vyhledávání v případě 8-plexu bylo provedeno pomocí *ProteinPilot* 4.0 (AB Sciex, MA, USA) proti databázi proteinových sekvencí *Zea mays* stažené z NCBI (106186 sekvencí k 29.6.2012). Kritéria pro vyhledávání byla následující: enzym = trypsin; taxonomie = *Zea mays*; stabilní modifikace = S-metylmethaniosulfonátová modifikace cysteinů, iTRAQ značení na N-konci a ϵ -amino skupině lysinu; variabilní modifikace = oxidace methioninu; tolerance hmotnosti peptidů = 120 ppm s tolerancí jednoho vynechaného místa štěpení; MS/MS tolerance = 0,2 Da; maximální pořadí peptidů = 1; minimální iontové skóre C.I. (peptid) = 95%. Kvantifikace byla provedena pomocí *GPS Explorer* v. 3.6 nebo *ProteinPilot* 4.0 a poměry jednotlivých proteinů byly normalizovány také v těchto programech. Jako kritická hladina pro detekci proteinů byla nastavena hladina 2,0 a konfidenční interval byl nastaven na 99 %.

Poměry iTRAQ pro všechny možné páry byly vypočítány se základním nastavením programů, změny násobků proteinů (iTRAQ poměr pro jednotlivé proteiny) byly automaticky počítány jako vážený průměr logaritmu iTRAQ poměrů určených pro jednotlivé peptidy patřící konkrétnímu proteinu (po odečtení pozadí). Pro každý iTRAQ poměr každého proteinu byla určena hladina statistické pravděpodobnosti a faktor chyby. Pouze iTRAQ poměry $\geq 2,0$ byly považovány za rozdílnou expresi proteinů.

Výsledky analýzy iTRAQ byly primárně vyjádřeny jako několik různých poměrů porovnávajících různé experimentální varianty. Odpověď jednotlivých genotypů na stres suchem byla vyjádřena jako poměr S_X/C_X , kde S_X představuje stresovanou rostlinu a C_X představuje kontrolní rostlinu určitého genotypu X ; pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila, byl použit poměr $-1/(S_X/C_X)$. iTRAQ analýza byla také použita pro srovnání odlišného chování genotypů v rámci jednoho způsobu pěstování (kontrola nebo sucho). V rámci čtvrtého experimentálního celku šlo o srovnání obou rodičovských linií (C_{P1}/C_{P2} a S_{P1}/S_{P2} , resp. $-1/(C_{P1}/C_{P2})$ a $-1/(S_{P1}/S_{P2})$, přičemž $P1$ znamená inbrední linii 2023 a $P2$ inbrední linii CE704). Použit byl také odvozený poměr $(C_{P2}/S_{P2})/(C_{P1}/S_{P1})$, případně (pokud šlo o proteiny s nižší hladinou u stresovaných rostlin) poměr $-1/[(C_{P2}/S_{P2})/(C_{P1}/S_{P1})]$, aby mohla být přímo porovnána odlišná reakce obou hodnocených genotypů na sucho. V rámci pátého experimentálního celku byly kromě obou rodičovských linií mezi sebou porovnávány také F1 kříženci s rodičovskými liniemi (tedy C_{F1}/C_P a S_{F1}/S_P , kde $F1$ představuje vždy jednoho ze dvou hodnocených F1 kříženců a P jednu z hodnocených

rodičovských linií; v případě, že byla vyšší hladina proteinů u inbrední linie, byly tyto poměry vyjádřeny jako $-1/(C_{FI}/C_P)$ pro kontrolní a $-1/(S_{FI}/S_P)$ pro stresované rostliny). V tomto pokusném celku byly dále srovnávány i oba reciproci F1 kříženci mezi sebou ($C_{FI}/C_{FI'}$, $S_{FI}/S_{FI'}$, resp. $-1/(C_{FI}/C_{FI'})$ a $-1/(S_{FI}/S_{FI'})$, přičemž FI znamená křížence 2023×CE704 a FI' křížence CE704×2023). Odvozené poměry v tomto případě již použity nebyly.

3.2.9. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu

Třetí z hlavních pokusných celků mé práce byl zaměřen na stanovení citlivosti/odolnosti k suchu v souboru 25 inbredních linií kukuřice. Za tím účelem byly pro příslušné hodnocené charakteristiky u každého z těchto genotypů vypočítány dva indexy citlivosti/odolnosti k suchu, a to TOL („stress tolerance“; Rosielle *et* Hamblin 1981) a SSI („stress susceptibility index“; Fisher *et* Maurer 1978). Tyto indexy byly počítány podle následujících vzorců:

$$TOL = Y_C - Y_S$$

$$SSI = [1 - (Y_S/Y_C)] / [1 - (\bar{Y}_S/\bar{Y}_C)]$$

kde Y_S , resp. Y_C , je hodnota příslušné charakteristiky u daného genotypu ve stresových, resp. kontrolních podmínkách a \bar{Y}_S , resp. \bar{Y}_C , je průměr hodnot příslušné charakteristiky u rostlin všech genotypů hodnoceného souboru, opět ve stresových, resp. kontrolních podmínkách.

3.2.10. Statistická analýza

Statistická významnost rozdílů v měřených charakteristikách byla vždy hodnocena nejprve analýzou variance (ANOVA), a to buď dvojného třídění s interakcemi (možnými zdroji variability byly genotypy, způsob pěstování a jejich interakce), nebo jednoduchého třídění (možnými zdroji variability byly jednotlivé pokusné varianty, tj. konkrétní kombinace genotyp/pěstování). Po analýze variance jednoduchého třídění následoval některý z *post-hoc* testů. U prvního experimentálního celku šlo o Fisherův LSD test, v ostatních případech byl použit Tukeyho, resp. Tukeyho-Kramerův test. Vzájemný vztah mezi měřenými charakteristikami byl hodnocen pomocí Pearsonova korelačního koeficientu (r); jako základní data pro jeho výpočet sloužily průměry absolutních hodnot příslušných charakteristik (první a třetí experimentální celek). V rámci prvního experimentálního celku byly dále počítány korelační koeficienty charakterizující vztah mezi reakcí rodičů a jejich F1 kříženců na suchu (jako výchozí data byly v tomto případě použity poměry průměrných hodnot příslušné charakteristiky naměřené u stresovaných rostlin ve srovnání s kontrolními rostlinami daného genotypu). V rámci třetího experimentálního celku byly obdobně stanoveny i korelace mezi indexy citlivosti/odolnosti k suchu vypočítanými na základě různých měřených charakteristik. Za kritickou hladinu statistické významnosti byla ve všech případech považována hranice 5 % ($p = 0,05$). Pro veškeré statistické hodnocení byl použit program *CoStat*, verze 6.204 (*CoHort Software, CA, USA*).

3.2.11. Kvantitativně genetická analýza

V rámci prvního experimentálního celku byly analyzovány rovněž genetické efekty uplatňující se v dědičnosti vybraných fotosyntetických a morfologických charakteristik, a to pomocí analýzy založené na modifikovaném kvantitativně-genetickém modelu, který popsali Eberhart *et* Gardner (1966). Tato analýza umožnila odhalit relativní význam aditivních (A), dominantních (D) a aditivních maternálních (M) efektů v dědičnosti hodnocených charakteristik. Je založena na předpokladu, že průměrné hodnoty příslušné charakteristiky pro jednotlivé genotypy zahrnuté do analyzovaného systému křížení mohou být vyjádřeny pomocí lineární kombinace parametrů představujících různé genetické efekty (**Tab. 6**). Při odhadu hodnot těchto genetických parametrů byly postupně použity čtyři modely: nejjednodušší zahrnoval kromě parametru představujícího celkový průměr pouze genetické efekty typu A , druhý model k nim přidal i genetické efekty typu D , třetí model kombinoval A a M genetické efekty a konečně čtvrtý model zahrnul všechny tři typy genetických efektů (tento model reprezentují rovnice uvedené v **Tab. 6**). Hodnoty jednotlivých genetických parametrů byly odhadovány metodou vážených nejmenších čtverců a vhodnost každého z výše uvedených modelů byla testována χ^2 testem. Jestliže hodnota χ^2 testu pro nejjednodušší model (tj. zahrnující pouze A) přesahovala kritickou hodnotu (při $p = 0,05$), tento model byl zamítnut a na data byl aplikován druhý

model. Pokud ani tento druhý model nevyhovoval, aplikován byl model třetí, případně čtvrtý. Konečné hodnoty odhadů parametrů popisujících jednotlivé genetické efekty pocházely vždy z nejlépe vyhovujícího modelu a jejich statistická průkaznost byla testována t-testem. Analýza byla prováděna za použití programu *CBE3* v rámci programového balíku *CBE*, verze 4.0 (Wolf 1996).

Tab. 6. Rovnice představující průměrné hodnoty měřených charakteristik pro genotypy zahrnuté do souboru/systému křížení hodnoceného v rámci prvního experimentálního celku (inbrední rodičovské linie 2013, 2023, 2086, CE704, CE810 a 10 jejich kříženců F1 generace: 2013×CE704, 2013×CE810, 2023×2086, 2023×CE704, 2086×2023, CE704×2013, CE704×2023, CE704×CE810, CE810×2013 a CE810×CE704). Rovnice jsou založeny na lineární kombinaci parametrů představujících jednotlivé genetické efekty: m ... obecný průměr příslušné charakteristiky (přes všechny genotypy); A ... aditivní genetický efekt konkrétní rodičovské inbrední linie; D ... dominantní genetický efekt pro konkrétní kombinaci rodičovských linií; M ... aditivní maternální efekt konkrétní rodičovské linie.

| Genotyp | Lineární kombinace parametrů popisujících jednotlivé genetické efekty |
|--------------------|--|
| 2013 | $m + A_{2013} + M_{2013}$ |
| 2023 | $m + A_{2023} + M_{2023}$ |
| 2086 | $m + A_{2086} + M_{2086}$ |
| CE704 | $m + A_{CE704} + M_{CE704}$ |
| CE810 | $m + A_{CE810} + M_{CE810}$ |
| 2013×CE704 | $m + \frac{1}{2}A_{2013} + \frac{1}{2}A_{CE704} + D_{2013 \times CE704} + M_{2013}$ |
| 2013×CE810 | $m + \frac{1}{2}A_{2013} + \frac{1}{2}A_{CE810} + D_{2013 \times CE810} + M_{2013}$ |
| 2023×2086 | $m + \frac{1}{2}A_{2023} + \frac{1}{2}A_{2086} + D_{2023 \times 2086} + M_{2023}$ |
| 2023×CE704 | $m + \frac{1}{2}A_{2023} + \frac{1}{2}A_{CE704} + D_{2023 \times CE704} + M_{2023}$ |
| 2086×2023 | $m + \frac{1}{2}A_{2023} + \frac{1}{2}A_{2086} + D_{2023 \times 2086} + M_{2086}$ |
| CE704×2013 | $m + \frac{1}{2}A_{2013} + \frac{1}{2}A_{CE704} + D_{2013 \times CE704} + M_{CE704}$ |
| CE704×2023 | $m + \frac{1}{2}A_{2023} + \frac{1}{2}A_{CE704} + D_{2023 \times CE704} + M_{CE704}$ |
| CE704×CE810 | $m + \frac{1}{2}A_{CE704} + \frac{1}{2}A_{CE810} + D_{CE704 \times CE810} + M_{CE704}$ |
| CE810×2013 | $m + \frac{1}{2}A_{2013} + \frac{1}{2}A_{CE810} + D_{2013 \times CE810} + M_{CE810}$ |
| CE810×CE704 | $m + \frac{1}{2}A_{CE704} + \frac{1}{2}A_{CE810} + D_{CE704 \times CE810} + M_{CE810}$ |

4. Výsledky

4.1. Experimentální celek 1

V prvním pokusném celku jsem se věnovala analýze možnosti využití vybraných fotosyntetických a morfologických charakteristik pro predikci reakce na sucho u potomků na základě reakce jejich rodičů, a to v rámci souboru pěti inbredních rodičovských linií a jejich deseti kříženců F1 generace. S touto analýzou byl spojen i odhad genetických efektů uplatňujících se v dědičnosti těchto charakteristik. Výsledky této části shrnují **Tab. 1-15**.

Rostliny byly vystaveny silnému stresu suchem v kombinaci s vysokou teplotou. Tento stres u všech hodnocených genotypů vyvolal statisticky významné změny hodnocených charakteristik (**Tab. 7-10**): pokles RWC, F_v/F_m a obsahu Chl *a* a *b* (**Tab. 9, 10**). Obsah Kar, DMS a LDH byly u stresovaných rostlin většinou také nižší než u kontrolních, i když tyto rozdíly nebyly statisticky průkazné u všech hodnocených genotypů (**Tab. 8, 10**). Hodnoty F_0 v důsledku vystavení rostlin vodnímu deficitu statisticky průkazně narostly (**Tab. 10**) a obdobný trend byl zaznamenán pro WUE, i když v tomto případě byl pozorovaný nárůst statisticky průkazný spíše výjimečně (**Tab. 9**). Jak SLW, tak hmotnost sušiny čtvrtého listu a hmotnost sušiny kořenů většinou nevykazovaly žádné statisticky významné změny v důsledku vodního deficitu (**Tab. 8**). V případě charakteristik výměny plynů (P_N , E , g_s) jsem změny jejich hodnot u rostlin stresovaných suchem nalezla, ale nedal se vypožarovat žádný jednoznačný trend: u některých genotypů se hodnoty těchto parametrů v důsledku stresu zvýšily, u jiných snížily nebo nezměnily oproti kontrole (**Tab. 9**). Toto bylo potvrzeno i výsledky analýzy variance, kde jsem pro tuto skupinu charakteristik zaznamenala statisticky průkazné interakce mezi genotypy a způsoby pěstování (**Tab. 7**). V případě ostatních hodnocených charakteristik (s výjimkou RWC) nebyl tento zdroj variability statisticky průkazný, což znamená, že ačkoli se jednotlivé genotypy mezi sebou lišily (viz výsledky analýzy variance a LSD testů), odezva všech na změnu v zásobování vody byla pro tyto charakteristiky obdobná (**Tab. 7**).

Vysoké hodnoty P_N , E a g_s v rámci rodičovských inbredních linií vykazovala především linie 2086, zatímco linie CE704 se vyznačovala nízkými hodnotami těchto charakteristik (**Tab. 9**). Pro inbrední linii 2013 byl v kontrolních podmínkách pěstování charakteristický vysoký obsah fotosyntetických pigmentů, ale v podmínkách stresu suchem ji v tomto ohledu převýšila linie CE810 (**Tab. 10**). Inbrední linie 2023 obvykle vykazovala nízký obsah Chl i Kar a také nejnižší hodnoty F_v/F_m mezi rodičovskými genotypy v podmínkách nedostatku vody (**Tab. 10**). Pořadí F1 kříženců záviselo jak na hodnocené charakteristice, tak na podmínkách pěstování a nebyl zde zřetelný žádný společný trend (**Tab. 8-10**).

Vzájemný vztah mezi různými morfologickými a fotosyntetickými charakteristikami byl určen na základě výpočtu Pearsonových korelačních koeficientů. Pozitivní, statisticky vysoce významnou ($p \leq 0,01$) korelaci jsem nalezla mezi P_N a E ($r = 0,79 \pm 0,12$), stejně jako mezi P_N a g_s ($r = 0,91 \pm 0,08$) nebo E a g_s ($r = 0,84 \pm 0,10$). Další pozitivní korelace existovaly mezi F_v/F_m , obsahem Chl a Kar, RWC, výškou rostlin a DMS, zatímco F_0 významně negativně korelovala s obsahem fotosyntetických pigmentů, RWC a DMS (**Tab. 11**). Charakteristiky výměny plynů nekorelovaly ani s RWC, ani s charakteristikami fluorescence chlorofylu, obsahem fotosyntetických pigmentů či morfologickými charakteristikami. Další korelace mezi fotosyntetickými a morfologickými charakteristikami rostlin také nebyly statisticky významné (hodnoty a statistické průkaznosti příslušných korelačních koeficientů zde neuvádím). WUE nekorelovala s žádnou z hodnocených fotosyntetických či morfologických charakteristik.

Při srovnání odezvy jednotlivých F1 kříženců na nedostatek vody a odezvy jejich příslušného mateřské nebo otcovské rodičovské linie (jako výchozí data byly v tomto případě použity poměry průměrných hodnot příslušné charakteristiky naměřené u stresovaných rostlin ve srovnání s kontrolními rostlinami daného genotypu) jsem pro žádnou z hodnocených charakteristik nenalezla statisticky průkaznou korelaci (**Tab. 12**). To znamená, že na základě toho, jak na sucho změnami těchto charakteristik reagují rodičovské linie, nebylo možné předpovědět reakci jejich F1 kříženců. Důvody tohoto jevu dále odhalila kvantitativně-genetická analýza, pomocí které jsem detekovala různé typy genetických efektů uplatňujících se v dědičnosti hodnocených charakteristik.

Odhady parametrů reprezentujících hlavní typy těchto genetických efektů jsou uvedeny v **Tab. 13-15**. Z výsledků této genetické analýzy bylo možné učinit tři hlavní závěry. Bylo jasné zřejmé, že genetické mechanismy uplatňující se v dědičnosti jednotlivých charakteristik se měnily v závislosti na způsobu pěstování rostlin (tj. genetické efekty statisticky průkazné u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách byly často neprůkazné u rostlin stresovaných suchem a *vice versa*, případně, pokud byl příslušný genetický efekt průkazný v obou podmínkách pěstování, jeho charakter se často změnil z pozitivního na negativní nebo obráceně) (**Tab. 13-15**). Dalším poznatkem vyplývajícím z této analýzy byl důkaz důležité úlohy neaditivních (dominantních, maternálních) genetických efektů, spojených s určitou konkrétní kombinací rodičů nebo určitým směrem křížení, v dědičnosti hodnocených charakteristik; tyto efekty byly nejméně stejně významné (někdy i významnější) než čistě aditivní genetické efekty (toto platilo především pro charakteristiky výměny plynů u rostlin vystavených vodnímu deficitu; **Tab. 14**). A konečně, každá z hodnocených charakteristik vykazovala specifickou kombinaci genetických efektů uplatňujících se v její dědičnosti (tj. mezi jednotlivými charakteristikami v tomto ohledu nebyla shoda), což zabránilo výběru jakékoliv rodičovské linie nebo F1 křížence jakožto genotypů s dobrou obecnou (aditivní genetické efekty) nebo specifickou (neaditivní genetické efekty) kombinační schopností.

Tab. 7. Analýza variance vybraných morfologických a fyziologických charakteristik u pěti inbredních linií kukuřice a jejich deseti kříženců F1 generace pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu. Jako možné zdroje variability byly zahrnuty rozdíly mezi genotypy (G), mezi způsobem pěstování (P) a jejich interakce (G×P). Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (*p*), statisticky průkazné rozdíly jsou zvýrazněny silně.

| Charakteristika | G | P | G×P |
|---|---------|---------|---------|
| Specifická hmotnost 4. listu (SLW) | 0,78 | 0,78 | 0,20 |
| Hmotnost sušiny 4. listu (DM4L) | < 0,001 | 0,04 | 0,64 |
| Hmotnost sušiny nadzemní části rostliny (DMS) | < 0,001 | < 0,001 | 0,24 |
| Hmotnost sušiny kořenů (DMR) | < 0,001 | < 0,001 | 0,09 |
| Výška rostlin k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu (LDH) | < 0,001 | < 0,001 | 1,00 |
| Relativní obsah vody v listech (RWC) | < 0,001 | < 0,001 | 0,02 |
| Vodivost průduchů (g_s) | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| Rychlost transpirace (E) | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) | < 0,001 | 0,02 | < 0,001 |
| “Okamžitá” efektivita využití vody (WUE) | 0,01 | < 0,001 | 0,68 |
| Základní intenzita fluorescence chlorofylu (F_0) | 0,03 | < 0,001 | 0,18 |
| Maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie ve fotosystému II (F_v/F_m) | 0,72 | < 0,001 | 0,85 |
| Obsah chlorofylu <i>a</i> (Chl <i>a</i>) | < 0,001 | < 0,001 | 0,15 |
| Obsah chlorofylu <i>b</i> (Chl <i>b</i>) | < 0,001 | < 0,001 | 0,23 |
| Obsah celkových karotenoidů (Kar) | < 0,001 | < 0,001 | 0,19 |

Tab. 8. Vybrané morfologické charakteristiky rostlin (SLW ... specifická hmotnost 4. listu, DM4L ... hmotnost sušiny 4. listu, DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin, LDH ... výška rostliny stanovená k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu) **u pěti inbredních linií kukuřice** (2013, 2023, 2086, CE704, CE810) **a jejich deseti kříženců F1 generace** pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho). Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n=6$). Písmena $a - n$ značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. Statistická průkaznost byla určena LSD testem, v posledním řádku tabulky jsou uvedeny LSD hodnoty významné pro $p = 0,05$.

| Genotyp | SLW [mg m ⁻²] | DM4L [g] | DMS [g] | DMR [g] | LDH [cm] |
|----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Kontrola | | | | | |
| 2013 | 16,22 \pm 2,34 ^{abcd} | 0,08 \pm 0,02 ^{klm} | 0,74 \pm 0,34 ^{defg} | 0,18 \pm 0,09 ^h | 15,9 \pm 4,6 ^{defghijk} |
| 2023 | 15,63 \pm 2,34 ^{abcd} | 0,15 \pm 0,02 ^{bcd} | 1,19 \pm 0,26 ^{cd} | 0,32 \pm 0,07 ^{fgh} | 17,8 \pm 1,9 ^{bcd} |
| 2086 | 16,30 \pm 5,62 ^{abcd} | 0,06 \pm 0,03 ^m | 0,69 \pm 0,52 ^{defg} | 0,22 \pm 0,15 ^{gh} | 10,7 \pm 3,8 ^{mn} |
| CE704 | 16,57 \pm 1,35 ^{abcd} | 0,09 \pm 0,04 ^{ijklm} | 1,32 \pm 0,33 ^{bc} | 0,45 \pm 0,14 ^{cdef} | 16,9 \pm 2,7 ^{cdefg} |
| CE810 | 14,74 \pm 2,10 ^{cd} | 0,10 \pm 0,02 ^{ghijkl} | 0,97 \pm 0,28 ^{cdef} | 0,25 \pm 0,07 ^{gh} | 16,8 \pm 2,1 ^{cdefghi} |
| 2013 \times CE704 | 15,86 \pm 2,80 ^{abcd} | 0,13 \pm 0,04 ^{cdefgh} | 1,92 \pm 0,70 ^a | 0,58 \pm 0,20 ^{abcd} | 18,9 \pm 3,9 ^{abcd} |
| CE704 \times 2013 | 17,89 \pm 2,36 ^{abc} | 0,13 \pm 0,02 ^{cdefghi} | 2,08 \pm 0,71 ^a | 0,57 \pm 0,19 ^{abcd} | 18,5 \pm 2,7 ^{bcd} |
| 2013 \times CE810 | 16,75 \pm 1,68 ^{abcd} | 0,14 \pm 0,03 ^{bcd} | 2,03 \pm 0,55 ^a | 0,54 \pm 0,16 ^{abcd} | 22,1 \pm 2,6 ^a |
| CE810 \times 2013 | 18,40 \pm 1,27 ^{ab} | 0,16 \pm 0,02 ^{bc} | 2,03 \pm 0,56 ^a | 0,60 \pm 0,14 ^{abc} | 20,0 \pm 3,1 ^{abc} |
| 2023 \times 2086 | 18,16 \pm 1,76 ^{abc} | 0,21 \pm 0,04 ^a | 1,83 \pm 0,60 ^{ab} | 0,56 \pm 0,15 ^{abcd} | 16,1 \pm 2,7 ^{defghij} |
| 2086 \times 2023 | 15,16 \pm 2,63 ^{bcd} | 0,12 \pm 0,04 ^{defghij} | 1,15 \pm 0,70 ^{cd} | 0,33 \pm 0,18 ^{fgh} | 15,8 \pm 3,4 ^{defghijk} |
| 2023 \times CE704 | 16,10 \pm 2,96 ^{abcd} | 0,18 \pm 0,07 ^{ab} | 1,75 \pm 0,63 ^{ab} | 0,52 \pm 0,14 ^{bcd} | 18,2 \pm 3,5 ^{bcd} |
| CE704 \times 2023 | 15,39 \pm 2,44 ^{bcd} | 0,14 \pm 0,02 ^{bcd} | 1,82 \pm 0,31 ^{ab} | 0,63 \pm 0,10 ^{ab} | 18,1 \pm 3,0 ^{bcd} |
| CE704 \times CE810 | 16,04 \pm 0,91 ^{abcd} | 0,15 \pm 0,05 ^{bcd} | 1,96 \pm 0,76 ^a | 0,69 \pm 0,25 ^a | 18,7 \pm 3,2 ^{abcd} |
| CE810 \times CE704 | 17,04 \pm 1,82 ^{abcd} | 0,12 \pm 0,05 ^{defghij} | 1,97 \pm 0,67 ^a | 0,58 \pm 0,17 ^{abcd} | 21,0 \pm 3,5 ^{ab} |
| Sucho | | | | | |
| 2013 | 19,09 \pm 9,09 ^a | 0,06 \pm 0,03 ^{lm} | 0,40 \pm 0,27 ^g | 0,17 \pm 0,06 ^h | 12,6 \pm 2,8 ^{klm} |
| 2023 | 14,86 \pm 1,61 ^{bcd} | 0,16 \pm 0,02 ^{bcd} | 0,96 \pm 0,37 ^{cdef} | 0,45 \pm 0,12 ^{cdef} | 14,3 \pm 3,0 ^{ghijkl} |
| 2086 | 18,36 \pm 4,73 ^{abc} | 0,07 \pm 0,02 ^{klm} | 0,48 \pm 0,27 ^{fg} | 0,23 \pm 0,10 ^{gh} | 9,1 \pm 2,9 ⁿ |
| CE704 | 17,15 \pm 1,14 ^{abcd} | 0,09 \pm 0,04 ^{hijklm} | 0,85 \pm 0,47 ^{cdefg} | 0,45 \pm 0,18 ^{cdef} | 13,4 \pm 2,8 ^{ijklm} |
| CE810 | 17,88 \pm 5,53 ^{abc} | 0,09 \pm 0,02 ^{ijkl} | 0,59 \pm 0,23 ^{efg} | 0,24 \pm 0,09 ^{gh} | 14,3 \pm 1,9 ^{ghijkl} |
| 2013 \times CE704 | 15,69 \pm 3,10 ^{abcd} | 0,11 \pm 0,04 ^{efghijk} | 0,96 \pm 0,33 ^{cdef} | 0,45 \pm 0,18 ^{cdef} | 14,6 \pm 1,1 ^{efghijkl} |
| CE704 \times 2013 | 17,99 \pm 2,56 ^{abc} | 0,12 \pm 0,04 ^{cdefghij} | 1,15 \pm 0,45 ^{cd} | 0,55 \pm 0,16 ^{abcd} | 14,6 \pm 2,9 ^{efghijkl} |
| 2013 \times CE810 | 16,09 \pm 2,61 ^{abcd} | 0,13 \pm 0,03 ^{cdefg} | 1,11 \pm 0,28 ^{cde} | 0,43 \pm 0,10 ^{def} | 17,6 \pm 2,0 ^{bcd} |
| CE810 \times 2013 | 13,82 \pm 4,16 ^d | 0,14 \pm 0,03 ^{cdefg} | 1,18 \pm 0,49 ^{cd} | 0,44 \pm 0,16 ^{def} | 18,0 \pm 2,7 ^{bcd} |
| 2023 \times 2086 | 15,39 \pm 2,69 ^{bcd} | 0,18 \pm 0,05 ^{ab} | 1,02 \pm 0,33 ^{cde} | 0,48 \pm 0,13 ^{bcd} | 13,3 \pm 2,7 ^{ijklm} |
| 2086 \times 2023 | 16,16 \pm 2,61 ^{abcd} | 0,15 \pm 0,03 ^{bcd} | 0,76 \pm 0,45 ^{defg} | 0,32 \pm 0,15 ^{fgh} | 12,2 \pm 3,3 ^{lmn} |
| 2023 \times CE704 | 15,63 \pm 2,06 ^{abcd} | 0,15 \pm 0,02 ^{bcd} | 0,99 \pm 0,31 ^{cdef} | 0,45 \pm 0,14 ^{cdef} | 14,3 \pm 3,7 ^{hijkl} |
| CE704 \times 2023 | 17,40 \pm 1,27 ^{abcd} | 0,11 \pm 0,03 ^{efghijk} | 0,85 \pm 0,24 ^{cdefg} | 0,37 \pm 0,04 ^{efg} | 13,8 \pm 1,7 ^{hijklm} |
| CE704 \times CE810 | 15,83 \pm 2,96 ^{abcd} | 0,10 \pm 0,05 ^{efghijk} | 1,00 \pm 0,41 ^{cdef} | 0,44 \pm 0,14 ^{cdef} | 16,1 \pm 3,3 ^{defghij} |
| CE810 \times CE704 | 14,80 \pm 0,72 ^{bcd} | 0,11 \pm 0,02 ^{efghijk} | 0,96 \pm 0,29 ^{cdef} | 0,45 \pm 0,14 ^{cdef} | 17,0 \pm 2,8 ^{cdefgh} |
| LSD | 3,63 | 0,06 | 0,53 | 0,16 | 3,37 |

Tab. 9. Vybrané charakteristiky vodního režimu rostlin a výměny plynů (RWC ... relativní obsah vody, g_s ... vodivost průduchů, E ... rychlost transpirace, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, WUE ... "okamžitá" efektivita využití vody) **u pěti inbredních linií kukuřice** (2013, 2023, 2086, CE704, CE810) **a jejich deseti kříženců F1 generace** pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho). Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n=10$). Písmena *a – m* značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. Statistická průkaznost byla určena LSD testem, v posledním řádku tabulky jsou uvedeny LSD hodnoty významné pro $p = 0,05$.

| Genotyp | RWC [%] | g_s [mol m ⁻² s ⁻¹] | E [mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹] | P_N [μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹] | WUE [μmol mmol ⁻¹] |
|-----------------|----------------------------|---|---|--|-----------------------------------|
| Kontrola | | | | | |
| 2013 | 96,46±4,30 ^a | 0,06±0,02 ^{ghij} | 1,04±0,18 ^{defgh} | 8,65±4,41 ^{bcd} | 7,78±3,75 ^{def} |
| 2023 | 99,29±3,87 ^a | 0,11±0,04 ^{cde} | 1,26±0,25 ^{bcd} | 10,32±4,08 ^{abcd} | 7,88±2,39 ^{cdef} |
| 2086 | 92,28±13,45 ^a | 0,15±0,06 ^{ab} | 1,50±0,33 ^b | 11,94±3,28 ^a | 7,86±0,87 ^{cdef} |
| CE704 | 96,42±3,76 ^a | 0,05±0,01 ^{hijk} | 0,83±0,18 ^{hi} | 5,58±2,24 ^{hijkl} | 6,39±1,96 ^{ef} |
| CE810 | 89,90±4,14 ^a | 0,13±0,05 ^{bc} | 1,26±0,43 ^{bcd} | 10,40±5,65 ^{abc} | 7,38±3,01 ^{def} |
| 2013×CE704 | 93,51±8,95 ^a | 0,06±0,02 ^{ghi} | 0,96±0,24 ^{fghi} | 8,03±1,26 ^{cdefghi} | 8,67±1,15 ^{bcd} |
| CE704×2013 | 91,43±9,79 ^a | 0,08±0,04 ^{fgh} | 1,03±0,36 ^{efgh} | 6,88±3,72 ^{fghij} | 6,02±2,94 ^f |
| 2013×CE810 | 94,86±5,60 ^a | 0,11±0,03 ^{ghij} | 0,90±0,33 ^{ghi} | 5,74±2,57 ^{hijkl} | 6,73±4,09 ^{ef} |
| CE810×2013 | 93,44±7,99 ^a | 0,10±0,03 ^{cdef} | 1,28±0,24 ^{bcd} | 8,98±2,62 ^{bcd} | 6,87±1,00 ^{ef} |
| 2023×2086 | 92,39±8,55 ^a | 0,10±0,04 ^{cdef} | 1,29±0,35 ^{bc} | 9,45±4,01 ^{abc} | 6,86±1,98 ^{ef} |
| 2086×2023 | 97,02±1,71 ^a | 0,09±0,01 ^{defg} | 1,12±0,06 ^{cdefg} | 7,49±1,12 ^{efghi} | 6,68±0,83 ^{ef} |
| 2023×CE704 | 94,36±4,01 ^a | 0,11±0,05 ^{cdef} | 1,30±0,33 ^{bc} | 9,97±4,71 ^{abc} | 7,21±2,79 ^{def} |
| CE704×2023 | 97,35±2,54 ^a | 0,06±0,01 ^{ghij} | 1,02±0,11 ^{fgh} | 6,28±2,61 ^{ghijk} | 6,18±2,90 ^f |
| CE704×CE810 | 90,93±5,37 ^a | 0,12±0,06 ^{bcd} | 1,25±0,51 ^{cde} | 11,10±5,72 ^{ab} | 7,87±2,82 ^{cdef} |
| CE810×CE704 | 92,90±6,40 ^a | 0,11±0,06 ^{cd} | 1,29±0,42 ^{bcd} | 10,34±3,55 ^{abcd} | 8,08±0,90 ^{bcd} |
| Sucho | | | | | |
| 2013 | 58,86±11,00 ^b | 0,12±0,03 ^{cd} | 1,01±0,09 ^{fgh} | 10,01±1,02 ^{abcde} | 9,96±0,97 ^{abcd} |
| 2023 | 39,35±5,96 ^{cde} | 0,03±0,01 ^{ijk} | 0,55±0,04 ^{jk} | 4,55±0,61 ^{ijklm} | 8,30±1,12 ^{bcd} |
| 2086 | 47,74±14,65 ^c | 0,09±0,04 ^{defg} | 1,04±0,35 ^{efgh} | 10,41±3,02 ^{abc} | 10,79±3,12 ^{abc} |
| CE704 | 35,97±9,59 ^{def} | 0,02±0,00 ^k | 0,28±0,02 ^l | 2,39±1,51 ^m | 8,38±4,96 ^{bcd} |
| CE810 | 37,17±12,97 ^{def} | 0,08±0,02 ^{efgh} | 0,90±0,20 ^{ghi} | 9,41±1,52 ^{abc} | 10,90±2,52 ^{ab} |
| 2013×CE704 | 34,00±4,35 ^{def} | 0,06±0,02 ^{ghi} | 0,91±0,10 ^{ghi} | 8,28±1,90 ^{cdefgh} | 9,22±2,32 ^{bcd} |
| CE704×2013 | 28,28±9,99 ^f | 0,05±0,02 ^{hijk} | 0,75±0,18 ^{ij} | 5,30±2,85 ^{ijkl} | 7,04±3,94 ^{def} |
| 2013×CE810 | 29,73±9,98 ^{ef} | 0,09±0,04 ^{defg} | 1,15±0,27 ^{cdef} | 9,43±3,65 ^{abc} | 8,82±6,11 ^{bcd} |
| CE810×2013 | 32,28±8,52 ^{def} | 0,02±0,00 ^k | 0,48±0,10 ^{kl} | 3,23±2,52 ^{lm} | 6,40±3,35 ^{ef} |
| 2023×2086 | 38,99±11,53 ^{cde} | 0,07±0,03 ^{ghi} | 0,93±0,05 ^{fghi} | 7,65±0,50 ^{defghi} | 8,22±0,50 ^{bcd} |
| 2086×2023 | 38,50±15,20 ^{cde} | 0,03±0,00 ^{jk} | 0,47±0,06 ^{kl} | 3,79±2,28 ^{klm} | 8,00±4,73 ^{bcd} |
| 2023×CE704 | 34,94±6,33 ^{def} | 0,16±0,06 ^a | 1,47±0,35 ^b | 11,40±3,32 ^a | 7,53±1,15 ^{def} |
| CE704×2023 | 40,31±4,37 ^{cd} | 0,11±0,02 ^{cd} | 1,74±0,24 ^a | 11,12±0,92 ^{ab} | 6,50±1,11 ^{ef} |
| CE704×CE810 | 35,58±12,22 ^{def} | 0,13±0,06 ^{bc} | 1,35±0,41 ^{bc} | 12,08±4,81 ^a | 8,48±1,96 ^{bcd} |
| CE810×CE704 | 34,43±7,60 ^{def} | 0,07±0,01 ^{ghi} | 0,94±0,35 ^{fghi} | 9,60±3,33 ^{abc} | 12,19±11,33 ^a |
| LSD | 9,85 | 0,04 | 0,26 | 2,97 | 3,17 |

Tab. 10. Vybrané charakteristiky fluorescence chlorofylu a obsahu fotosyntetických pigmentů (F_0 ... základní intenzita fluorescence chlorofylu, F_v/F_m ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie ve fotosystému II, Chl ... obsah chlorofylu, Kar ... obsah celkových karotenoidů) **u pěti inbredních linií kukuřice** (2013, 2023, 2086, CE704, CE810) **a jejich deseti kříženců F1 generace** pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho). Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n=6$). Písmena $a - m$ značí statistickou významnost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. Statistická průkaznost byla určena LSD testem, v posledním řádku tabulky jsou uvedeny LSD hodnoty významné pro $p = 0,05$. r.j. – relativní jednotky (fluorescence chlorofylu měřena fluorometrem OS30P).

| Genotyp | F_0 [r.j.] | F_v/F_m [r.j.] | Chl <i>a</i> [mg m ⁻²] | Chl <i>b</i> [mg m ⁻²] | Kar [mg m ⁻²] |
|----------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Kontrola | | | | | |
| 2013 | 33,25 \pm 1,08 ^{gh} | 0,81 \pm 0,00 ^a | 292,00 \pm 16,21 ^{abc} | 73,25 \pm 6,29 ^{abcd} | 52,20 \pm 1,50 ^{abcd} |
| 2023 | 34,50 \pm 4,43 ^{efgh} | 0,79 \pm 0,03 ^a | 236,63 \pm 19,79 ^{defg} | 64,32 \pm 7,10 ^{cdefg} | 42,29 \pm 2,98 ^{ijkl} |
| 2086 | 29,92 \pm 1,20 ^h | 0,81 \pm 0,01 ^a | 264,66 \pm 28,71 ^{bcde} | 65,81 \pm 10,01 ^{bcdef} | 51,41 \pm 3,93 ^{bcde} |
| CE704 | 32,25 \pm 2,89 ^h | 0,80 \pm 0,01 ^a | 252,87 \pm 30,74 ^{cdef} | 69,96 \pm 7,64 ^{abcde} | 44,65 \pm 4,49 ^{ghijkl} |
| CE810 | 32,08 \pm 3,40 ^h | 0,80 \pm 0,03 ^a | 226,23 \pm 80,99 ^{defgh} | 60,21 \pm 20,24 ^{defgh} | 44,20 \pm 10,47 ^{hijkl} |
| 2013 \times CE704 | 31,75 \pm 1,37 ^h | 0,80 \pm 0,02 ^a | 301,29 \pm 11,57 ^{abc} | 78,38 \pm 6,31 ^{ab} | 53,07 \pm 2,50 ^{abc} |
| CE704 \times 2013 | 31,58 \pm 1,72 ^h | 0,81 \pm 0,01 ^a | 308,97 \pm 32,24 ^{ab} | 80,20 \pm 11,45 ^a | 53,82 \pm 4,23 ^{ab} |
| 2013 \times CE810 | 32,83 \pm 1,97 ^{gh} | 0,80 \pm 0,02 ^a | 312,50 \pm 24,71 ^{ab} | 81,30 \pm 9,38 ^a | 57,88 \pm 1,99 ^a |
| CE810 \times 2013 | 34,50 \pm 2,24 ^{fgh} | 0,80 \pm 0,01 ^a | 309,72 \pm 22,99 ^{ab} | 79,47 \pm 7,68 ^a | 58,19 \pm 3,81 ^a |
| 2023 \times 2086 | 33,00 \pm 1,64 ^{gh} | 0,81 \pm 0,00 ^a | 326,30 \pm 33,68 ^a | 81,76 \pm 12,05 ^a | 58,03 \pm 5,52 ^a |
| 2086 \times 2023 | 32,42 \pm 1,02 ^{gh} | 0,81 \pm 0,01 ^a | 289,65 \pm 11,82 ^{abc} | 74,45 \pm 6,53 ^{abc} | 51,95 \pm 3,12 ^{abcde} |
| 2023 \times CE704 | 33,92 \pm 2,27 ^{fgh} | 0,80 \pm 0,01 ^a | 267,15 \pm 18,33 ^{bcd} | 71,84 \pm 8,49 ^{abcd} | 48,05 \pm 3,13 ^{bcdefghij} |
| CE704 \times 2023 | 32,67 \pm 2,60 ^{gh} | 0,80 \pm 0,01 ^a | 262,49 \pm 15,43 ^{bcde} | 70,01 \pm 8,38 ^{abcde} | 47,76 \pm 2,41 ^{bcdefghij} |
| CE704 \times CE810 | 33,33 \pm 1,44 ^{gh} | 0,80 \pm 0,01 ^a | 275,01 \pm 41,66 ^{abcd} | 74,76 \pm 13,16 ^{abc} | 50,26 \pm 7,06 ^{bcdefgh} |
| CE810 \times CE704 | 32,92 \pm 2,27 ^{gh} | 0,80 \pm 0,01 ^a | 293,65 \pm 35,56 ^{abc} | 77,56 \pm 11,51 ^{abc} | 53,90 \pm 5,19 ^{ab} |
| Sucho | | | | | |
| 2013 | 37,42 \pm 5,19 ^{defgh} | 0,64 \pm 0,15 ^{ab} | 190,78 \pm 56,32 ^{ghij} | 50,54 \pm 13,57 ^{hij} | 42,89 \pm 6,26 ^{ijkl} |
| 2023 | 51,17 \pm 12,14 ^a | 0,30 \pm 0,27 ^d | 108,19 \pm 24,58 ^k | 30,05 \pm 11,71 ^l | 34,27 \pm 4,99 ^m |
| 2086 | 37,08 \pm 7,30 ^{defgh} | 0,50 \pm 0,33 ^{bcd} | 199,32 \pm 65,33 ^{ghij} | 50,71 \pm 13,06 ^{hij} | 51,16 \pm 6,16 ^{bcdef} |
| CE704 | 49,83 \pm 11,04 ^{ab} | 0,44 \pm 0,26 ^{bcd} | 171,10 \pm 59,49 ^{ij} | 50,03 \pm 14,71 ^{hij} | 43,55 \pm 3,89 ^{ijkl} |
| CE810 | 37,33 \pm 8,37 ^{defgh} | 0,47 \pm 0,23 ^{bcd} | 214,55 \pm 57,23 ^{efghi} | 56,59 \pm 14,00 ^{efghi} | 45,01 \pm 6,75 ^{fghijkl} |
| 2013 \times CE704 | 37,25 \pm 8,94 ^{defgh} | 0,46 \pm 0,25 ^{bcd} | 205,36 \pm 50,51 ^{fghij} | 58,27 \pm 11,69 ^{efghi} | 46,79 \pm 7,41 ^{cdefghij} |
| CE704 \times 2013 | 40,08 \pm 3,14 ^{defg} | 0,47 \pm 0,21 ^{bcd} | 190,34 \pm 79,43 ^{ghij} | 52,02 \pm 17,31 ^{ghij} | 50,61 \pm 6,05 ^{bcdefg} |
| 2013 \times CE810 | 41,75 \pm 4,33 ^{cdef} | 0,40 \pm 0,22 ^{cd} | 187,30 \pm 58,37 ^{ghij} | 52,18 \pm 11,85 ^{ghij} | 48,09 \pm 10,38 ^{bcdefghij} |
| CE810 \times 2013 | 40,17 \pm 8,53 ^{defg} | 0,35 \pm 0,22 ^{cd} | 175,46 \pm 50,85 ^{hij} | 52,27 \pm 8,09 ^{ghij} | 49,14 \pm 4,93 ^{bcdefghi} |
| 2023 \times 2086 | 35,00 \pm 8,28 ^{efgh} | 0,51 \pm 0,26 ^{bcd} | 199,91 \pm 50,34 ^{ghij} | 49,90 \pm 11,00 ^{hij} | 47,78 \pm 4,76 ^{bcdefghij} |
| 2086 \times 2023 | 42,50 \pm 5,50 ^{bcde} | 0,50 \pm 0,32 ^{bcd} | 195,55 \pm 47,68 ^{ghij} | 49,55 \pm 11,29 ^{hij} | 47,89 \pm 8,20 ^{bcdefghij} |
| 2023 \times CE704 | 42,42 \pm 13,40 ^{bcde} | 0,31 \pm 0,27 ^{cd} | 155,96 \pm 43,01 ^{jk} | 40,33 \pm 12,20 ^{jk} | 39,74 \pm 3,81 ^{klm} |
| CE704 \times 2023 | 48,75 \pm 18,54 ^{abc} | 0,51 \pm 0,26 ^{bc} | 171,66 \pm 60,73 ^{ij} | 45,73 \pm 16,83 ^{ij} | 39,01 \pm 6,53 ^{lm} |
| CE704 \times CE810 | 43,50 \pm 5,43 ^{abcd} | 0,43 \pm 0,26 ^{cd} | 190,28 \pm 51,05 ^{ghij} | 53,79 \pm 13,15 ^{fghi} | 45,69 \pm 5,93 ^{efghijk} |
| CE810 \times CE704 | 44,75 \pm 10,24 ^{abcd} | 0,46 \pm 0,19 ^{bcd} | 181,84 \pm 44,55 ^{hij} | 51,54 \pm 11,93 ^{ghij} | 46,08 \pm 3,25 ^{deefghij} |
| LSD | 7,90 | 0,20 | 51,60 | 13,43 | 6,29 |

Tab 11. Korelace mezi vybranými parametry fluorescence chlorofylu (F_0 ... základní intenzita fluorescence chlorofylu, F_v/F_m ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie ve fotosystému II), obsahem fotosyntetických pigmentů (Chl ... chlorofyl, Kar ... celkové karotenoidy), relativním obsahem vody v listech (RWC), hmotností sušiny nadzemní části rostlin (DMS) a výškou rostlin, stanovenou k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu (LDH), analyzovanými u pěti inbredních linií kukuřice a jejich deseti kříženců F1 generace pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonových korelačních koeficientů (r) \pm SE(r) ($n = 30$) společně s označením jejich statistické průkaznosti (*... korelace je průkazná při $p = 0,05$, ** ... korelace je průkazná při $p = 0,01$, ns ... korelace není statisticky průkazná).

| Charakteristika | Chl <i>a</i> | Chl <i>b</i> | Kar | RWC | DMS | LDH |
|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| F_0 | -0,84 \pm 0,10 ** | -0,82 \pm 0,11 ** | -0,66 \pm 0,14 ** | -0,80 \pm 0,12 ** | -0,46 \pm 0,17 ** | ns |
| F_v/F_m | 0,90 \pm 0,08 ** | 0,89 \pm 0,09 ** | 0,58 \pm 0,15 ** | 0,97 \pm 0,05 ** | 0,57 \pm 0,16 ** | 0,46 \pm 0,17 * |
| Chl <i>a</i> | | 0,99 \pm 0,03 ** | 0,82 \pm 0,11 ** | 0,86 \pm 0,10 ** | 0,70 \pm 0,14 ** | 0,56 \pm 0,16 ** |
| Chl <i>b</i> | | | 0,80 \pm 0,11 ** | 0,85 \pm 0,10 ** | 0,74 \pm 0,13 ** | 0,64 \pm 0,15 ** |
| Kar | | | | 0,50 \pm 0,16 ** | 0,58 \pm 0,15 ** | 0,41 \pm 0,17 * |
| RWC | | | | | 0,60 \pm 0,15 ** | 0,51 \pm 0,16 ** |
| DMS | | | | | | 0,84 \pm 0,10 ** |

Tab. 12. Korelace mezi odezvou F1 kříženců kukuřice a odezvou jejich mateřské (Mat) nebo otcovské (Pat) rodičovské linie na podmínky vodního deficitu. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonových korelačních koeficientů (r) \pm SE(r) ($n = 30$) společně s označením jejich statistické průkaznosti (ns ... korelace není statisticky průkazná). Odezva jednotlivých genotypů na nedostatek vody (tj. základní data pro výpočet korelačních koeficientů) byla stanovena jako 100 \times (průměrná hodnota příslušné charakteristiky u stresovaných rostlin/průměrná hodnota příslušné charakteristiky u kontrolních rostlin).

| Charakteristika | F1 vs Mat | F1 vs Pat |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| Specifická hmotnost 4. listu (SLW) | -0,29 \pm 0,34 ^{ns} | -0,50 \pm 0,31 ^{ns} |
| Hmotnost sušiny 4. listu (DM4L) | 0,40 \pm 0,32 ^{ns} | 0,06 \pm 0,35 ^{ns} |
| Hmotnost sušiny nadzemní části rostliny (DMS) | 0,35 \pm 0,33 ^{ns} | 0,05 \pm 0,35 ^{ns} |
| Hmotnost sušiny kořenů (DMR) | 0,34 \pm 0,33 ^{ns} | -0,08 \pm 0,35 ^{ns} |
| Výška rostlin k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu (LDH) | 0,34 \pm 0,33 ^{ns} | 0,25 \pm 0,34 ^{ns} |
| Relativní obsah vody v listech (RWC) | -0,32 \pm 0,34 ^{ns} | -0,37 \pm 0,32 ^{ns} |
| Vodivost průduchů (g_s) | 0,17 \pm 0,35 ^{ns} | -0,47 \pm 0,31 ^{ns} |
| Rychlost transpirace (E) | -0,21 \pm 0,35 ^{ns} | -0,32 \pm 0,34 ^{ns} |
| Rychlost čisté fotosyntézy (P_N) | -0,07 \pm 0,35 ^{ns} | -0,30 \pm 0,34 ^{ns} |
| “Okamžitá” efektivita využití vody (WUE) | 0,19 \pm 0,35 ^{ns} | 0,18 \pm 0,35 ^{ns} |
| Základní intenzita fluorescence chlorofylu (F_0) | 0,19 \pm 0,35 ^{ns} | 0,34 \pm 0,33 ^{ns} |
| Maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie ve fotosystému II (F_v/F_m) | 0,11 \pm 0,35 ^{ns} | -0,42 \pm 0,32 ^{ns} |
| Obsah chlorofylu <i>a</i> (Chl <i>a</i>) | -0,05 \pm 0,35 ^{ns} | -0,10 \pm 0,35 ^{ns} |
| Obsah chlorofylu <i>b</i> (Chl <i>b</i>) | 0,49 \pm 0,31 ^{ns} | 0,10 \pm 0,35 ^{ns} |
| Obsah celkových karotenoidů (Kar) | 0,42 \pm 0,32 ^{ns} | -0,27 \pm 0,34 ^{ns} |

Tab. 13. Genetická analýza vybraných morfologických charakteristik (SLW ... specifická hmotnost 4. listu, DM4L ... hmotnost sušiny 4. listu, DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin, LDH ... výška rostliny stanovená k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu) **u pěti inbredních linií kukuřice** (2013, 2023, 2086, CE704, CE810) **a jejich deseti kříženců F1 generace** pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho). Uvedeny jsou odhady jednotlivých genetických efektů a jejich statistická průkaznost stanovená na základě t-testu (*... efekt je průkazný při $p = 0,05$, ** ... efekt je průkazný při $p = 0,01$, ns ... efekt není statisticky průkazný). m ... obecný průměr přes všechny genotypy, A ... aditivní genetický efekt, D ... dominantní genetický efekt, M ... maternální genetický efekt (subskeptory označují příslušnou inbrední rodičovskou linii nebo jejich kombinaci, ke které se daný genetický efekt vztahuje). NI ... příslušné parametry nebyly zahrnuty do genetického modelu uvedeného v tabulce, protože dané situaci lépe vyhovoval jednodušší genetický model; vhodnost modelu byla hodnocena χ^2 testem, jehož hodnoty (a statistická průkaznost) jsou uvedeny vždy na konci příslušného oddílu tabulky. Model 1 zahrmoval pouze parametry m a A , Model 2 parametry m , A a D , Model 3 parametry m , A a M a Model 4 parametry m , A , D , a M .

| Genetický efekt | SLW | DM4L | DMS | DMR | LDH |
|--------------------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| Kontrola | | | | | |
| m | 16,67 ** | 0,10 ** | 0,98 ** | 0,28 ** | 15,62 ** |
| A_{2013} | 1,97 ns | -0,01 ns | -0,24 ns | -0,10 ** | 0,28 ns |
| A_{2023} | -2,37 ns | 0,02 ns | 0,20 ns | 0,04 ns | 2,18 ** |
| A_{2086} | 2,58 ns | 0,01 ns | -0,29 ns | -0,06 ns | -4,92 ** |
| A_{CE704} | -0,58 ns | -0,01 ns | 0,33 ** | 0,16 ** | 1,28 ns |
| A_{CE810} | -1,61 ns | 0 ns | -0,01 ns | -0,03 ns | 1,18 ns |
| $D_{2013 \times CE704}$ | NI | 0,05 ** | 0,97 ** | 0,26 ** | 2,23 ns |
| $D_{2013 \times CE810}$ | NI | 0,07 ** | 1,17 ** | 0,36 ** | 4,87 ** |
| $D_{2023 \times 2086}$ | NI | 0,06 ** | 0,61 ** | 0,20 ** | 1,74 ns |
| $D_{2023 \times CE704}$ | NI | 0,04 * | 0,56 ** | 0,21 ** | 0,79 ns |
| $D_{CE704 \times CE810}$ | NI | 0,04 ** | 0,83 ** | 0,27 ** | 2,90 ** |
| M_{2013} | -1,02 ns | -0,01 ns | NI | NI | NI |
| M_{2023} | 1,27 ns | 0,04 * | NI | NI | NI |
| M_{2086} | -1,86 ns | -0,05 ns | NI | NI | NI |
| M_{CE704} | 0,44 ns | 0,01 ns | NI | NI | NI |
| M_{CE810} | 1,15 ns | 0,01 ns | NI | NI | NI |
| χ^2 pro Model 1 | 23,04 * | 121,92 ** | 80,06 ** | 101,84 ** | 23,20 * |
| χ^2 pro Model 2 | 12,56 * | 20,45 ** | 3,44 ns | 9,45 ns | 3,12 ns |
| χ^2 pro Model 3 | 8,25 ns | 91,07 ** | | | |
| χ^2 pro Model 4 | | 2,33 ns | | | |
| Sucho | | | | | |
| m | 16,01 ** | 0,09 ** | 0,66 ** | 0,31 ** | 12,74 ** |
| A_{2013} | 1,56 ns | -0,03 ** | -0,26 ** | -0,14 ** | -0,14 ns |
| A_{2023} | -0,62 ns | 0,06 ** | 0,30 * | 0,14 ** | 1,56 ns |
| A_{2086} | 1,01 ns | -0,02 * | -0,17 ns | -0,08 * | -3,64 ** |
| A_{CE704} | 1,18 * | 0 ns | 0,20 ns | 0,14 * | 0,66 ns |
| A_{CE810} | -3,14 ** | -0,01 ns | -0,07 ns | -0,06 ns | 1,56 * |
| $D_{2013 \times CE704}$ | NI | 0,04 ** | 0,40 ** | 0,19 ** | 1,60 ns |
| $D_{2013 \times CE810}$ | NI | 0,06 ** | 0,64 ** | 0,23 ** | 4,30 ** |
| $D_{2023 \times 2086}$ | NI | 0,05 ** | 0,21 ns | 0,07 ns | 1,16 ns |
| $D_{2023 \times CE704}$ | NI | 0,01 ns | -0,01 ns | -0,07 ns | 0,04 ns |
| $D_{CE704 \times CE810}$ | NI | 0,02 ns | 0,26 ns | 0,10 ns | 2,77 ** |
| χ^2 pro Model 1 | 16,50 ns | 60,31 ** | 37,82 ** | 65,15 ** | 26,08 ** |
| χ^2 pro Model 2 | | 9,36 ns | 2,92 ns | 8,25 ns | 0,84 ns |

Tab. 14. Genetická analýza vybraných charakteristik vodního režimu rostlin a výměny plynů (RWC ... relativní obsah vody, g_s ... vodivost průduchů, E ... rychlost transpirace, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, WUE ... "okamžitá" efektivita využití vody) **u pěti inbredních linií kukuřice** (2013, 2023, 2086, CE704, CE810) **a jejich deseti kříženců F1 generace** pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho). Uvedeny jsou odhady jednotlivých genetických efektů a jejich statistická průkaznost stanovená na základě t-testu (*... efekt je průkazný při $p = 0,05$, ** ... efekt je průkazný při $p = 0,01$, ns ... efekt není statisticky průkazný). m ... obecný průměr přes všechny genotypy, A ... aditivní genetický efekt, D ... dominantní genetický efekt, M ... maternální genetický efekt (subskripty označují příslušnou inbrední rodičovskou linii nebo jejich kombinaci, ke které se daný genetický efekt vztahuje). NI ... příslušné parametry nebyly zahrnuty do genetického modelu uvedeného v tabulce, protože dané situaci lépe vyhovoval jednodušší genetický model; vhodnost modelu byla hodnocena χ^2 testem, jehož hodnoty (a statistická průkaznost) jsou uvedeny vždy na konci příslušného oddílu tabulky. Model 1 zahrnoval pouze parametry m a A , Model 2 parametry m , A a D , Model 3 parametry m , A a M a Model 4 parametry m , A , D , a M .

| Genetický efekt | RWC | g_s | E | P_N | WUE |
|--------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|----------|
| Kontrola | | | | | |
| m | 94,96 ** | 0,10 ** | 1,18 ** | 9,38 ** | 7,46 ** |
| A_{2013} | 1,39 ns | 0 ns | 0,08 ns | 0,82 ns | 0,32 ns |
| A_{2023} | 3,86 ** | -0,02 ns | -0,11 ns | -1,22 ns | 0,42 ns |
| A_{2086} | -0,25 ns | 0,03 ns | 0,30 * | 2,36 ns | 0,40 ns |
| A_{CE704} | 0,03 ns | -0,04 ** | -0,26 ** | -2,27 ns | -1,07 ns |
| A_{CE810} | -5,02 ** | 0,03 ns | -0,02 ns | 0,30 ns | -0,08 ns |
| $D_{2013 \times CE704}$ | NI | 0,02 ** | 0,08 ns | 0,80 ns | 0,42 ns |
| $D_{2013 \times CE810}$ | NI | -0,02 ns | -0,05 ns | -2,15 ns | -0,72 ns |
| $D_{2023 \times 2086}$ | NI | -0,03 ** | -0,17 * | -2,66 ** | -1,16 ** |
| $D_{2023 \times CE704}$ | NI | 0,01 ns | 0,11 ns | 0,18 ns | -0,42 ns |
| $D_{CE704 \times CE810}$ | NI | 0,03 ns | 0,22 ns | 2,17 ns | 1,17 ns |
| M_{2013} | NI | -0,03 ** | -0,22 ** | -1,55 ns | NI |
| M_{2023} | NI | 0,03 ** | 0,19 * | 2,16 ns | NI |
| M_{2086} | NI | 0,02 ns | 0,02 ns | 0,20 ns | NI |
| M_{CE704} | NI | 0 ns | -0,09 ns | -1,53 ns | NI |
| M_{CE810} | NI | 0 ns | 0,10 ns | 0,72 ns | NI |
| χ^2 pro Model 1 | 8,03 ns | 42,18 ** | 38,24 ** | 49,63 ** | 20,33 * |
| χ^2 pro Model 2 | | 18,73 ** | 18,29 ** | 16,11 ** | 5,36 ns |
| χ^2 pro Model 3 | | 23,35 ** | 13,94 ** | 24,01 ** | |
| χ^2 pro Model 4 | | 1,00 ns | 1,14 ns | 3,89 * | |
| Sucho | | | | | |
| m | 43,82 ** | 0,07 ** | 0,75 ** | 7,35 ** | 9,67 ** |
| A_{2013} | 15,04 ** | 0,04 ** | -0,18 ** | -1,08 ns | -1,23 ns |
| A_{2023} | -4,47 ns | -0,08 ** | -0,20 ** | -3,69 ** | -1,26 ns |
| A_{2086} | 3,92 ns | 0,01 ns | 0,75 ** | 6,03 ** | 1,44 ns |
| A_{CE704} | -7,85 * | -0,05 ** | -0,74 ** | -5,57 ** | -0,16 ns |
| A_{CE810} | -6,65 ns | 0,07 ns | 0,36 ** | 4,31 ** | 1,21 ns |
| $D_{2013 \times CE704}$ | -14,33 ** | -0,01 ns | 0,18 ** | 0,55 ns | -1,17 ns |
| $D_{2013 \times CE810}$ | -16,81 ** | -0,04 ** | -0,15 ** | -3,42 ** | -3,08 ** |
| $D_{2023 \times 2086}$ | -4,73 ns | -0,01 * | -0,09 ns | -1,76 ** | -1,43 ns |
| $D_{2023 \times CE704}$ | 0,93 ns | 0,11 ** | 1,19 ** | 7,79 ** | -1,33 ns |
| $D_{CE704 \times CE810}$ | -1,82 ns | 0,05 ** | 0,56 ** | 5,01 ** | -0,51 ns |
| M_{2013} | NI | 0,01 ns | 0,43 ** | 3,74 ** | 1,53 ns |
| M_{2023} | NI | 0,05 ** | -0,01 ns | 0,89 ns | -0,10 ns |
| M_{2086} | NI | 0,01 ns | -0,47 ** | -2,97 ** | -0,32 ns |
| M_{CE704} | NI | 0 ns | 0,27 ** | 0,61 ns | -1,13 ns |
| M_{CE810} | NI | -0,06 ** | -0,22 ** | -2,26 * | 0,03 ns |
| χ^2 pro Model 1 | 35,30 ** | 871,37 ** | 1282,94 ** | 578,99 ** | 33,54 ** |
| χ^2 pro Model 2 | 4,84 ns | 304,84 ** | 452,56 ** | 58,77 ** | 11,40 * |
| χ^2 pro Model 3 | | 363,12 ** | 676,30 ** | 398,49 ** | 13,79 * |
| χ^2 pro Model 4 | | 0,02 ns | 0,30 ns | 0,09 ns | 0,84 ns |

Tab. 15. Genetická analýza vybraných charakteristik fluorescence chlorofylu a obsahu fotosyntetických pigmentů (F_0 ... základní intenzita fluorescence chlorofylu, F_v/F_m ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie ve fotosystému II, Chl ... obsah chlorofylu, Kar ... obsah celkových karotenoidů) u pěti inbredních linií kukuřice (2013, 2023, 2086, CE704, CE810) a jejich deseti kříženců F1 generace pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho). Uvedeny jsou odhady jednotlivých genetických efektů a jejich statistická průkaznost stanovená na základě t-testu (*... efekt je průkazný při $p = 0,05$, ** ... efekt je průkazný při $p = 0,01$, ns ... efekt není statisticky průkazný). m ... obecný průměr přes všechny genotypy, A ... aditivní genetický efekt, D ... dominantní genetický efekt (subskripty označují příslušnou inbrední rodičovskou linii nebo jejich kombinaci, ke které se daný genetický efekt vztahuje). NI ... příslušné parametry nebyly zahrnuty do genetického modelu uvedeného v tabulce, protože dané situaci lépe vyhovoval jednodušší genetický model; vhodnost modelu byla hodnocena χ^2 testem, jehož hodnoty (a statistická průkaznost) jsou uvedeny vždy na konci příslušného oddílu tabulky. Model 1 zahrnoval pouze parametry m a A , Model 2 parametry m , A a D .

| Genetický efekt | F_0 | F_v/F_m | Chl a | Chl b | Kar |
|--------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Kontrola | | | | | |
| m | 32,71 ** | 0,80 ** | 254,48 ** | 66,71 ** | 46,95 ** |
| A_{2013} | 0,27 ns | 0 ns | 37,52 ** | 6,54 * | 5,25 ** |
| A_{2023} | 2,39 ** | 0 ns | -17,85 ns | -2,39 ns | -4,66 ** |
| A_{2086} | -2,74 ** | 0,01 ** | 10,18 ns | -0,90 ns | 4,46 ** |
| A_{CE704} | -1,22 * | 0 ns | -1,61 ns | 3,25 ns | -2,30 ns |
| A_{CE810} | 1,31 * | -0,01 ** | -28,25 ns | -6,50 ns | -2,75 ns |
| $D_{2013 \times CE704}$ | NI | NI | 29,73 ** | 7,20 * | 4,84 ** |
| $D_{2013 \times CE810}$ | NI | NI | 51,89 ** | 13,48 ** | 9,75 ** |
| $D_{2023 \times 2086}$ | NI | NI | 43,03 ** | 11,04 ** | 6,57 ** |
| $D_{2023 \times CE704}$ | NI | NI | 19,67 * | 3,77 ns | 4,40 ** |
| $D_{CE704 \times CE810}$ | NI | NI | 46,24 * | 11,27 * | 8,20 ** |
| χ^2 pro Model 1 | 8,60 ns | 0,44 ns | 53,78 ** | 24,41 ** | 60,10 ** |
| χ^2 pro Model 2 | | | 7,59 ns | 2,26 ns | 6,78 ns |
| Sucho | | | | | |
| m | 41,25 ** | 0,46 ** | 185,35 ** | 49,90 ** | 45,82 ** |
| A_{2013} | -3,86 * | 0,11 * | 4,37 ns | 2,55 ns | 1,55 ns |
| A_{2023} | 5,60 ns | -0,11 ns | -63,06 ** | -15,82 ** | -10,08 ** |
| A_{2086} | -5,53 * | 0,09 ns | 48,65 ** | 6,77 ns | 8,47 ** |
| A_{CE704} | 2,88 ns | -0,02 ns | 0,83 ns | 2,55 ns | -1,40 ns |
| A_{CE810} | 0,91 ns | -0,07 ns | 9,21 ns | 3,94 ns | 1,46 ns |
| $D_{2013 \times CE704}$ | NI | NI | NI | NI | NI |
| $D_{2013 \times CE810}$ | NI | NI | NI | NI | NI |
| $D_{2023 \times 2086}$ | NI | NI | NI | NI | NI |
| $D_{2023 \times CE704}$ | NI | NI | NI | NI | NI |
| $D_{CE704 \times CE810}$ | NI | NI | NI | NI | NI |
| χ^2 pro Model 1 | 11,45 ns | 0,78 ns | 7,72 ns | 6,51 ns | 13,70 ns |

4.2. Experimentální celek 2

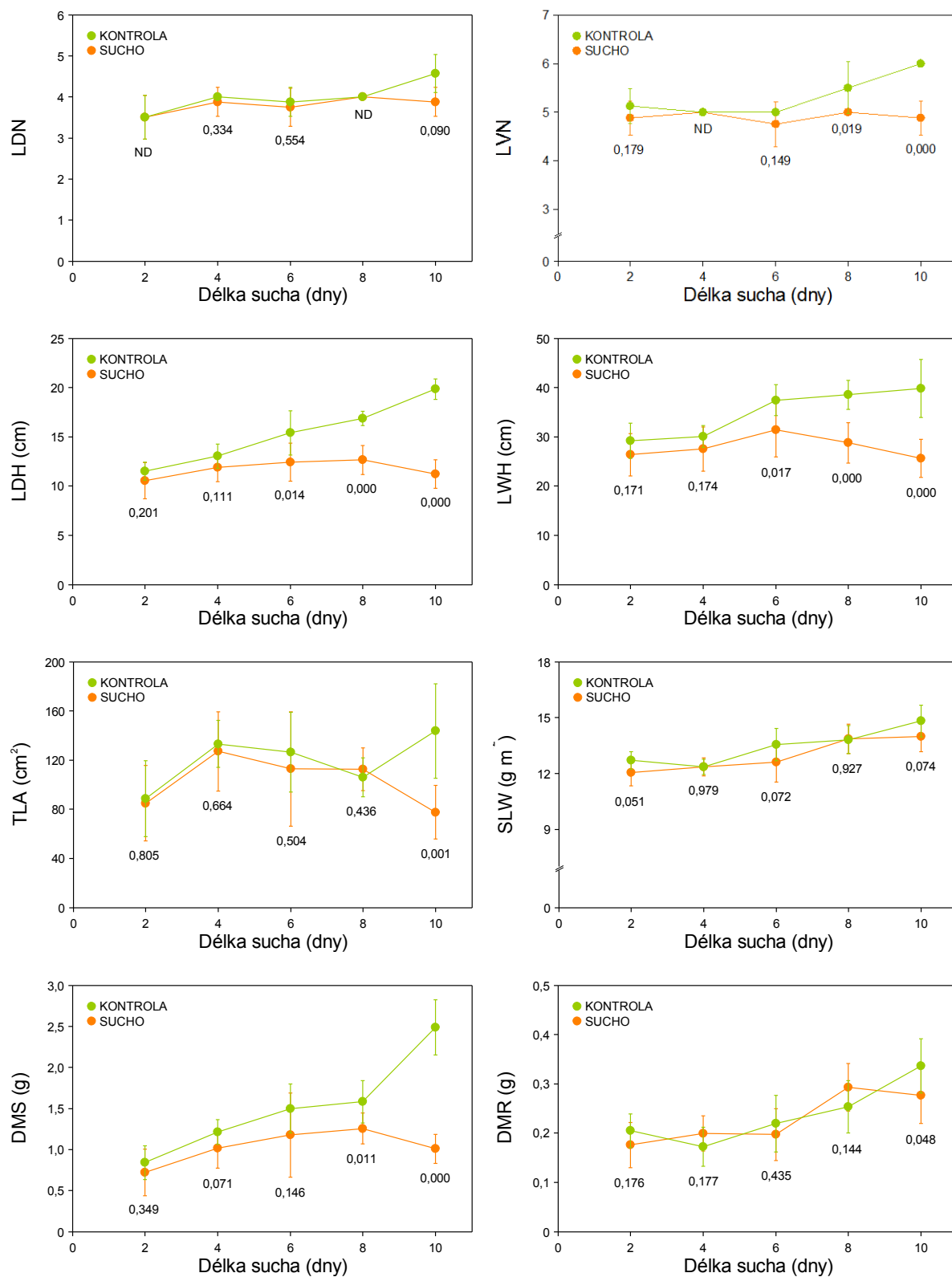
Druhý experimentální celek měl za cíl podle časového průběhu stresové odpovědi, hodnocené na základě změn hodnot různých morfologických a fyziologických charakteristik, vybrat nejvhodnější délku stresové periody pro další pokusy. Tato měření byla prováděna na inbrední linii 2023, která byla součástí genotypového souboru hodnoceného v experimentálním celku 1, a zároveň její osivo bylo k dispozici pro další pokusy a mohla tak být zahrnuta do souboru analyzovaného v rámci třetího experimentálního celku (viz kap. 3.1 a 4.3). Některé charakteristiky byly měřeny v jednodenních intervalech, jiné (vyžadující destrukci pokusných rostlin nebo časově náročnější na měření) ve dvoudenních intervalech. Výsledky těchto měření a statistického hodnocení rozdílů mezi kontrolními a stresovanými rostlinami v jednotlivých pokusných dnech shrnují **Obr. 1-7**.

Měření ukázala, že v prvních šesti dnech od začátku periody sucha u stresovaných rostlin většinou nedochází k průkazným změnám hodnocených charakteristik ve srovnání s kontrolními rostlinami. Pouze výška rostlin vyjádřená jako LDH i LWH byla v šestém dnu u stresovaných rostlin již průkazně nižší (**Obr. 1**). Zajímavé trendy jsem však pozorovala pro počáteční fázi stresové periody u charakteristik souvisejících s výměnou plynů mezi listem a vnějším prostředím. P_N byla ve druhém a čtvrtém dnu u stresovaných rostlin průkazně vyšší než u kontrolních (**Obr. 2**), v šestém dnu se její hodnoty mezi oběma variantami nelišily a v osmém a desátém dnu se u stresovaných rostlin průkazně snížily. Obdobný trend platil i pro g_s , i když u této charakteristiky nebyl rozdíl mezi kontrolními a stresovanými rostlinami v počáteční fázi stresové periody statisticky průkazný (**Obr. 2**). Hodnoty E byly ve srovnání s kontrolou průkazně nižší po dvou dnech sucha, ve čtvrtém dnu stresové periody se vyrovnaly s kontrolními hodnotami a poté opět průkazně klesly (**Obr. 2**). V případě WUE jsem zaznamenala statisticky průkazně vyšší hodnoty této charakteristiky u stresovaných rostlin v prvních šesti dnech po začátku periody sucha, poté se ale dostaly na úroveň kontrolních hodnot, zatímco pro WUE_i platilo již od čtvrtého dne periody sucha, že její hodnoty jsou u stresovaných rostlin průkazně vyšší než u rostlin kontrolních (**Obr. 2**). Také poměr $Chl\ a/b$ byl na počátku stresového období průkazně vyšší u stresovaných rostlin než u kontrolních, a tento rozdíl později vymizel (**Obr. 4**).

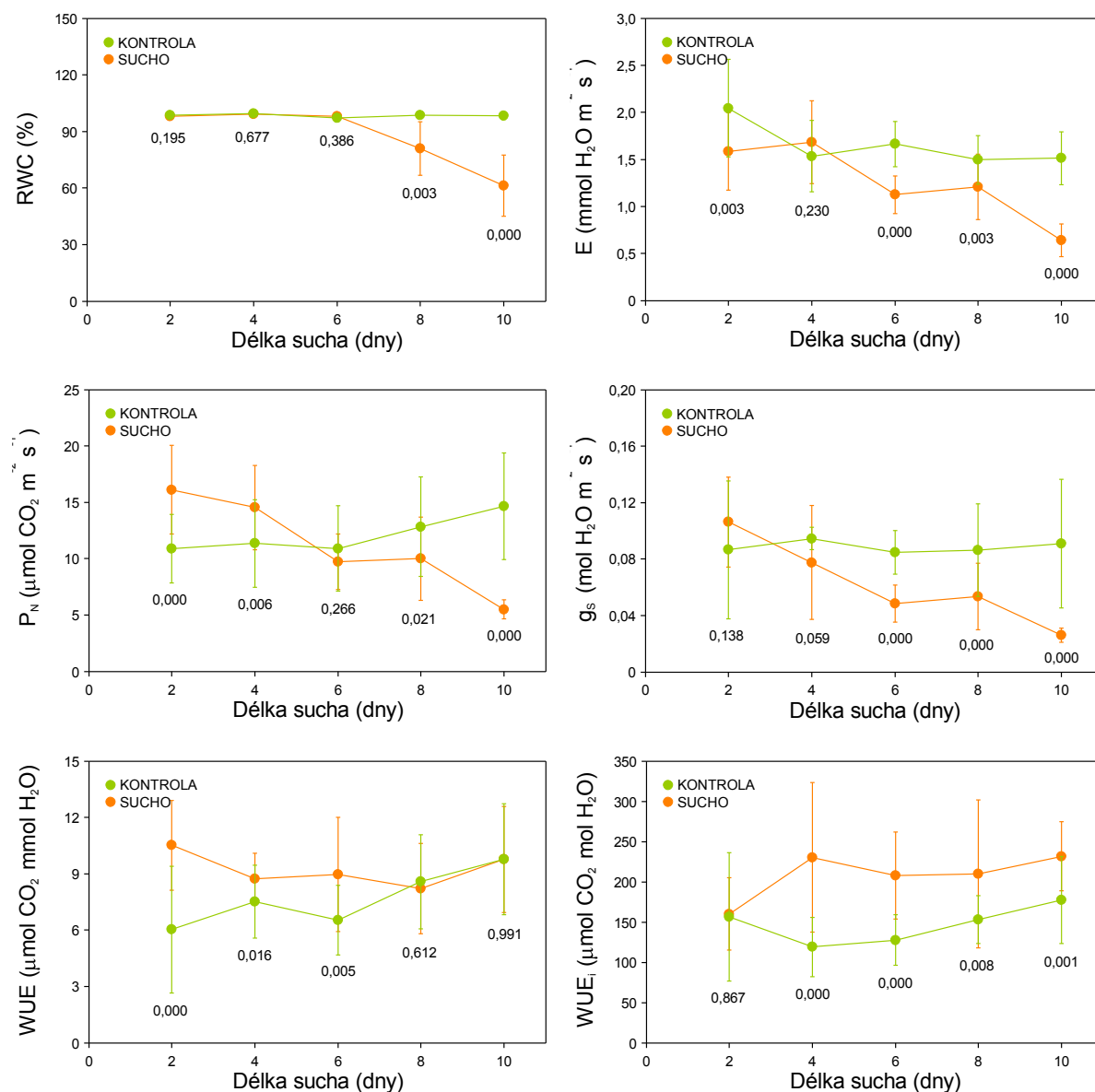
U většiny ostatních hodnocených charakteristik se statisticky průkazné rozdíly mezi kontrolními a suchem stresovanými rostlinami objevily od 7. (resp. 8.) dne sucha. To platilo pro morfologické charakteristiky jako LVN a DMS (**Obr. 1**), RWC (**Obr. 2**), většinu charakteristik primárních fotosyntetických procesů získaných analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence Chl (**Obr. 5, 6**) a obsah Chl a Kar vyjádřený na jednotku plochy listu nebo stanovený pomocí NDVI a PRI indexů (**Obr. 3, 4**). V morfologických parametrech LDN, TLA a DMR se mezi sebou kontrolní a stresované rostliny průkazně lišily až v desátém dnu po zahájení periody sucha (**Obr. 1**). Při vyjádření obsahu Chl nebo Kar na jednotku sušiny listu nebyly rozdíly mezi kontrolní a stresovanou variantou tak výrazné a často nebyly průkazné vůbec (**Obr. 4**), což zřejmě souviselo i s pozorovaným trendem změn SLW (**Obr. 1**). Ani v poměru $Chl\ (a+b)$ se mezi sebou stresované a kontrolní rostliny po celou dobu periody sucha nelišily (**Obr. 4**). Parametry OJIP analýzy spojené s transportem elektronů až na koncové akceptory za PSI (Ψ_{RE0} , Φ_{RE0} , RE_0/RC) také většinou neměly rozdílné hodnoty u kontrolních a stresovaných rostlin (**Obr. 5, 6**); tento jev byl zřejmý i z časové závislosti relativní variabilní fluorescence W_{IP} , která znázorňuje rychlost fotosyntetického elektronového transportu až k PSI – poloha jednotlivých křivek se mezi sebou v podstatě nelišila (**Obr. 7**). Ani velikost hotovosti (poolu) PSI akceptorů nebyla – s výjimkou desátého dne po začátku periody sucha – nějak zřetelně nižší u stresovaných rostlin ve srovnání s kontrolními, jak ukázaly křivky relativní variabilní fluorescence W_{OI} , resp. jejich část s hodnotami W_{OI} vyššími než 1 (**Obr. 7**). K-pás znázorněný pomocí křivky diferenční kinetiky ΔW_{OJ} a reprezentující funkční stav OEC, případně velikost LHCI, byl výraznější opět až od sedmého dne stresové periody (pozitivní hodnoty ΔW_{OJ} reprezentují inaktivaci OEC a/nebo zvětšení světlosběrné antény $PSII$) a totéž platilo i pro L-pás zřejmý na křivkách diferenční kinetiky ΔW_{OK} , který vypovídá o energetické konektivitě mezi jednotlivými $PSII$ komplexy; i v tomto případě byla počínaje sedmým dnem sucha tato konektivita horší (pozitivní hodnoty ΔW_{OK}) u stresovaných rostlin ve srovnání s kontrolními (**Obr. 7**).

Na základě uvedených výsledků jsem pro další pokusy vybrala časový bod 10 dnů sucha jakožto dobu, kdy jsou rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami již velmi zřetelné v naprosté většině charakteristik, a dále časový bod 6 dnů sucha jakožto jakýsi „přelomový“ bod, kdy v mladých rostlinách kukuřice zřejmě dochází k různými fyziologickým a biochemickým změnám souvisejícím s přechodem do „stresového módu“.

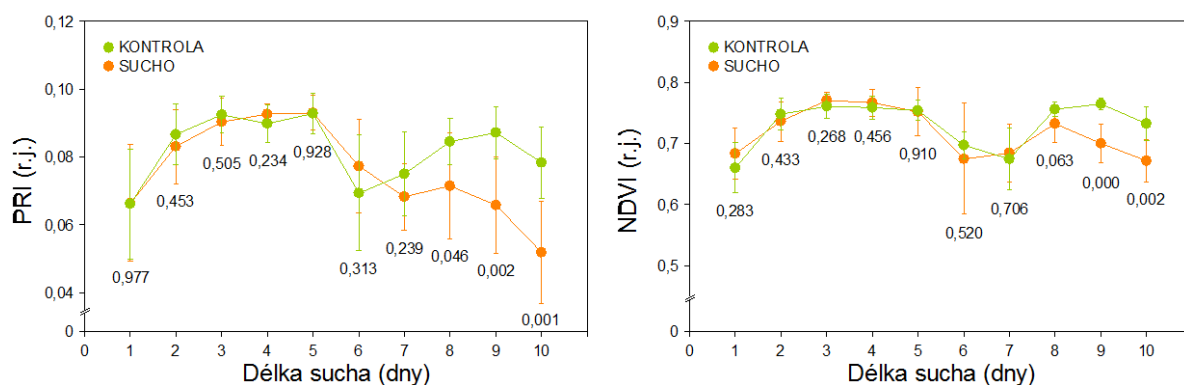
Obr. 1. Vybrané morfologické charakteristiky rostlin (LDN ... počet plně vyvinutých listů, LVN ... počet všech viditelných listů, LDH ... výška rostliny stanovená k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu, LWH ... výška rostliny stanovená ke špičce listu viditelného ve vrcholové růžici, TLA ... celková plocha všech alespoň částečně fotosyntetizujících listů (zahrnuty jen plně vyvinuté listy), SLW ... specifická hmotnost 4. listu, DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin) u inbrední linie kukuřice 2023 pěstované v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavené vodnímu deficitu (Sucho) v době 2 – 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD (n = 8). Čísla pod značkami reprezentujícími průměrné hodnoty příslušného parametru uvádějí statistickou průkaznost (p) rozdílů mezi kontrolními a stresovanými rostlinami (ND ... vzhledem k nedostatečné variabilitě nebylo možné určit).



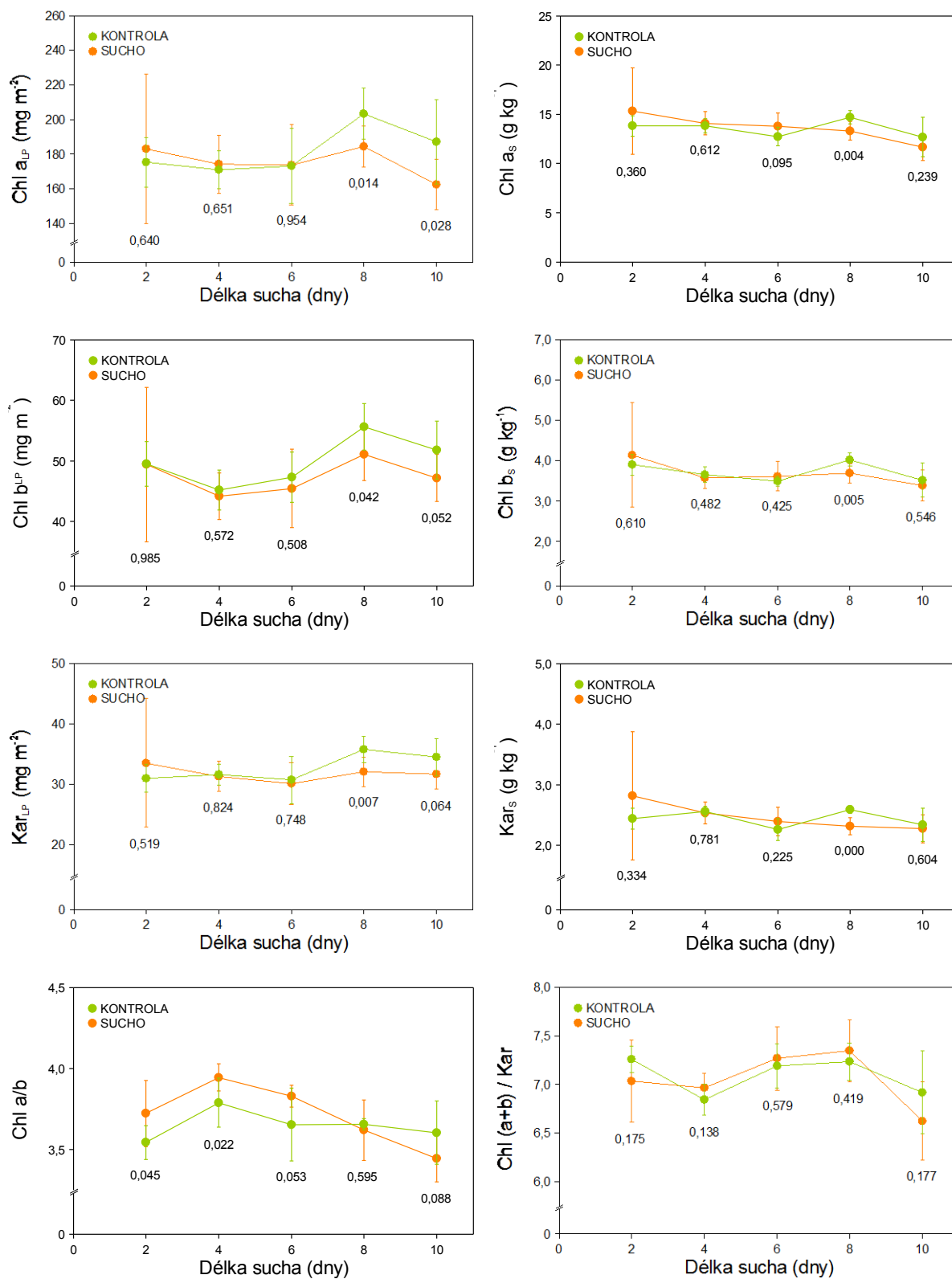
Obr. 2. Vybrané charakteristiky vodního režimu rostlin a výměny plynů (RWC ... relativní obsah vody, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, E ... rychlost transpirace, g_s ... vodivost průduchů, WUE ... „okamžitá“ efektivita využití vody, WUE_i ... „vnitřní“ efektivita využití vody) **u inbrední linie kukuřice 2023** pěstované v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavené vodnímu deficitu (Sucho) **v době 2 – 10 dnů od začátku stresové periody**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 10$). Čísla pod značkami reprezentujícími průměrné hodnoty příslušného parametru uvádějí statistickou průkaznost (p) rozdílů mezi kontrolními a stresovanými rostlinami.



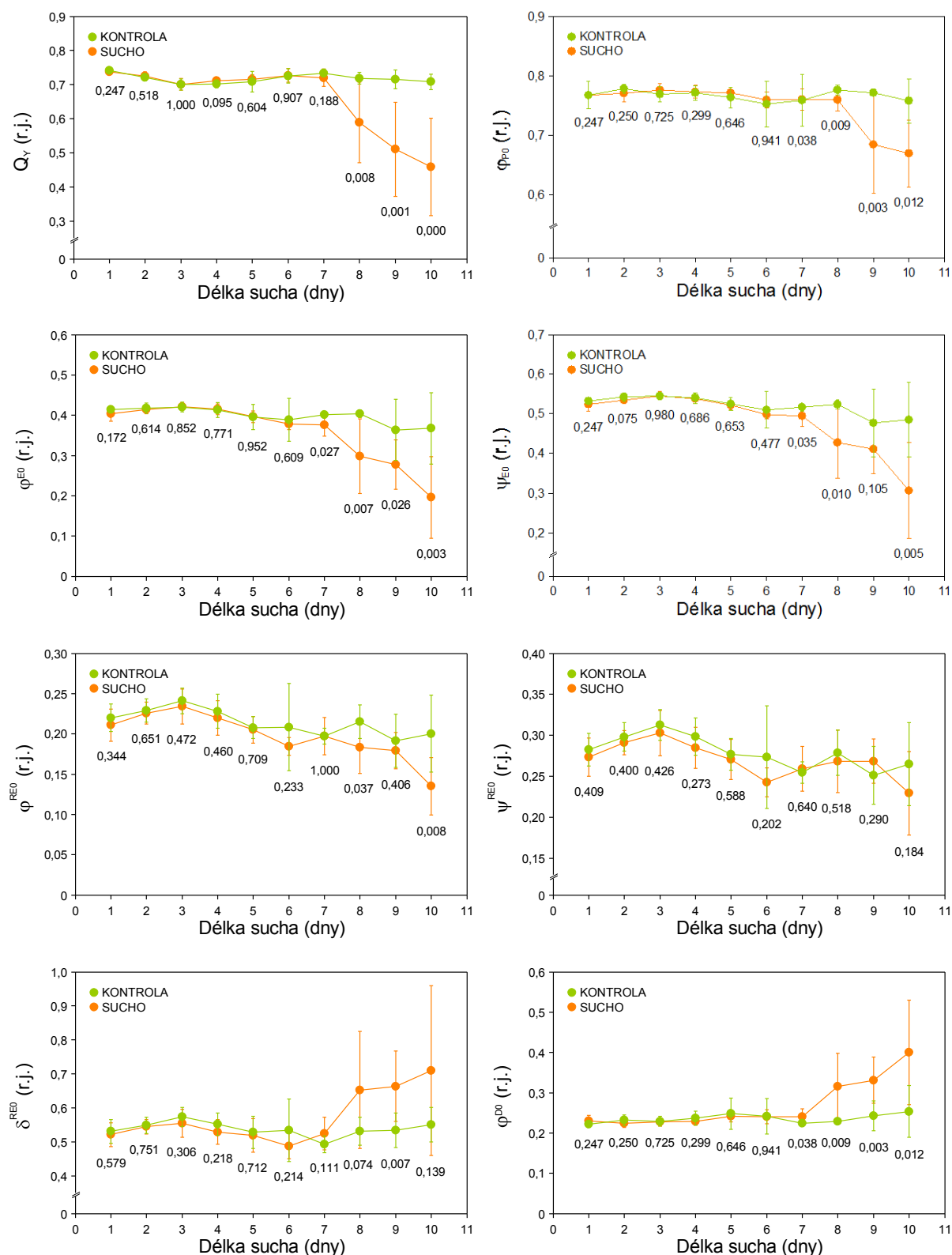
Obr. 3. Fotochemický reflektanční index (PRI) a normalizovaný diferenční vegetační index (NDVI) u inbrední linie kukuřice 2023 pěstované v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavené vodnímu deficitu (Sucho) **v době 1 – 10 dnů od začátku stresové periody**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n=10$). Čísla pod značkami reprezentujícími průměrné hodnoty příslušného parametru uvádějí statistickou průkaznost (p) rozdílů mezi kontrolními a stresovanými rostlinami. r.j. – relativní jednotky.



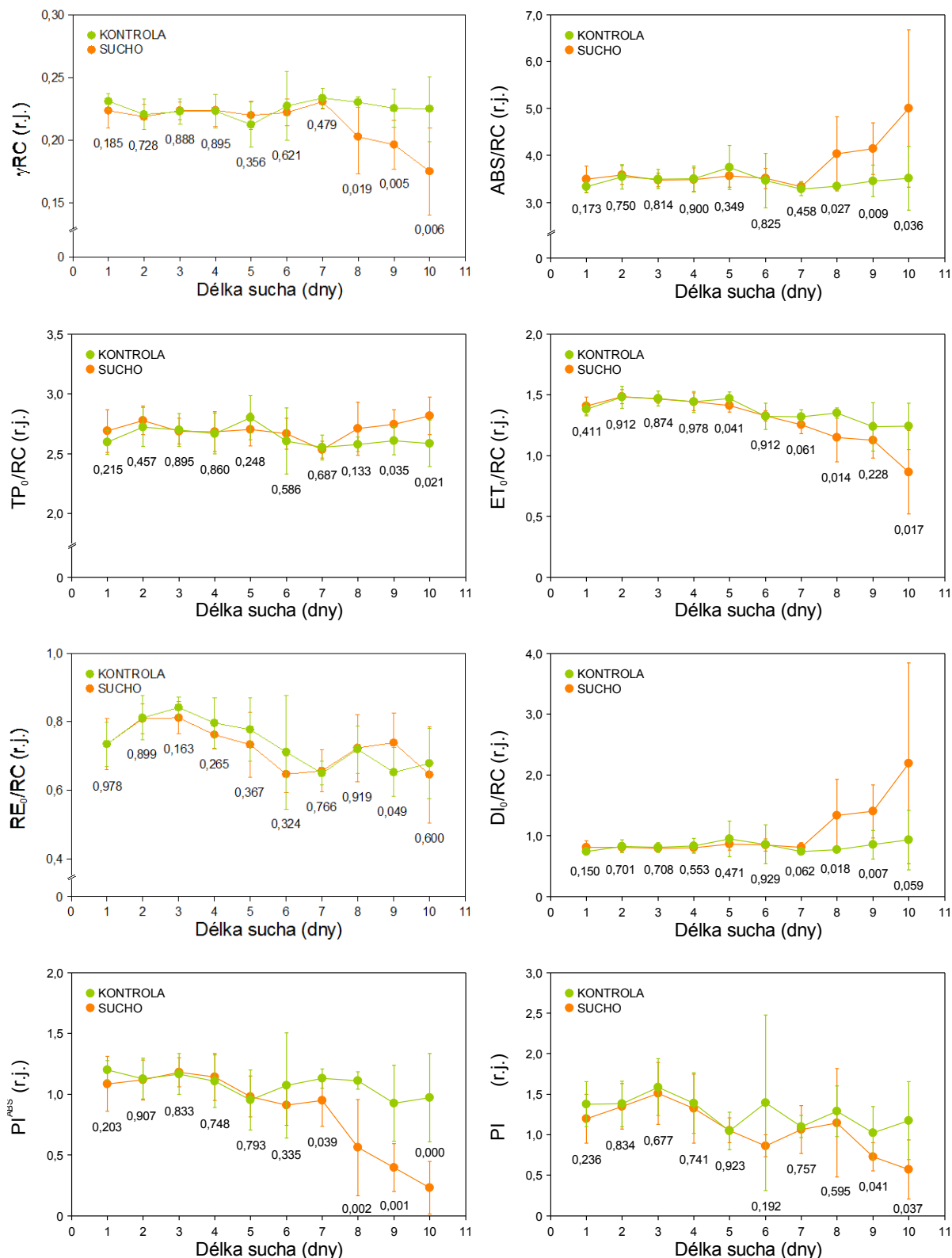
Obr. 4. Obsahy a poměry fotosyntetických pigmentů vyjádřené v přepočtech na jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) (Chl ... chlorofyl, Kar ... celkové karotenoidy) **u inbrední linie kukuřice 2023** pěstované v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavené vodnímu deficitu (Sucho) **v době 2 – 10 dnů od začátku stresové periody**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 8$). Čísla pod značkami reprezentujícími průměrné hodnoty příslušného parametru uvádějí statistickou průkaznost (p) rozdílů mezi kontrolními a stresovanými rostlinami.



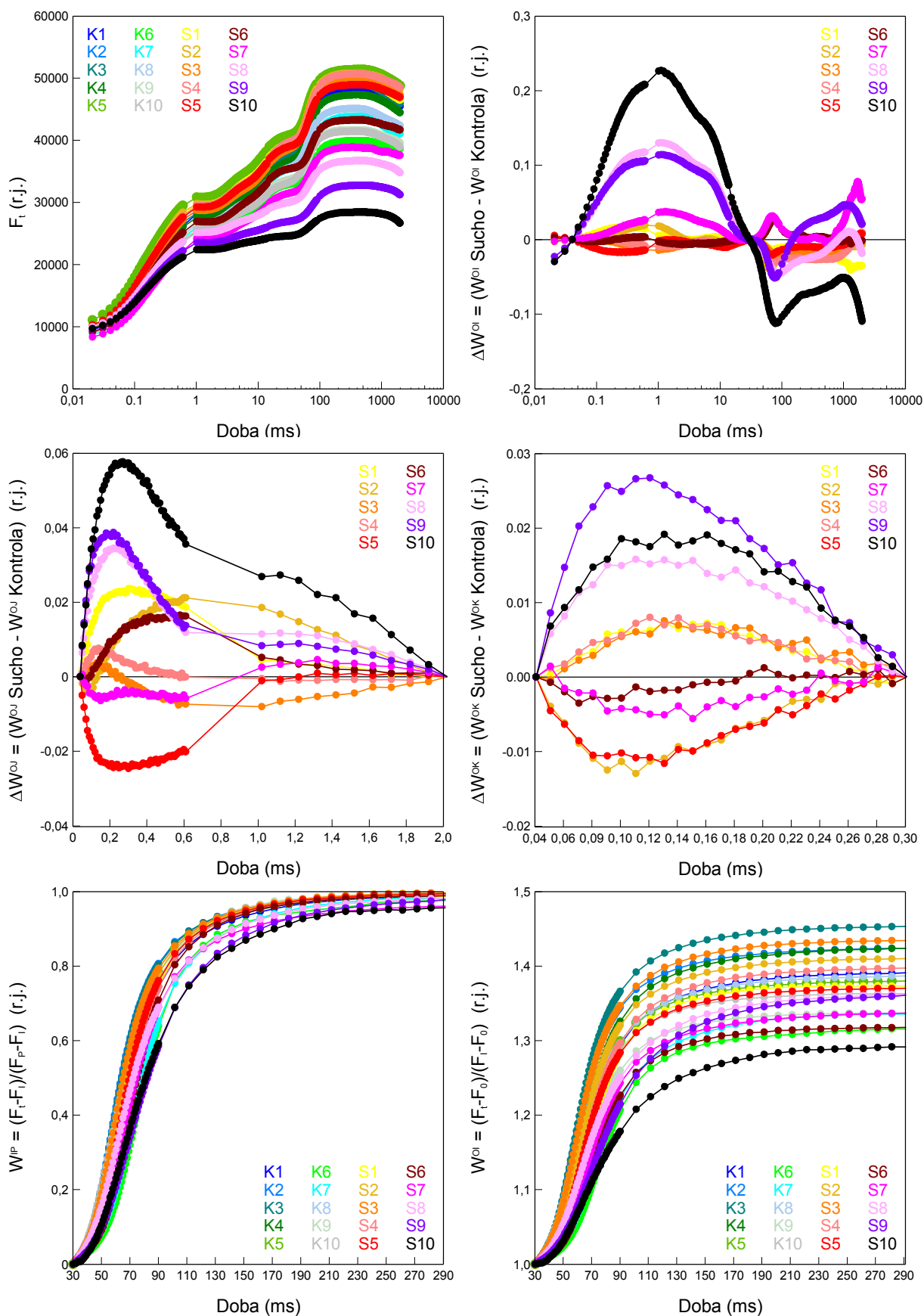
Obr. 5. Maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u listů ve světelně adaptovaném stavu (Q_Y) a další charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu (ϕ_{P0} ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, ϕ_{E0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B , ψ_{E0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B , ϕ_{RE0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, ψ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, δ_{RE0} ... účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, ϕ_{D0} ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie) u inbrední linie kukuřice 2023 pěstované v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavené vodnímu deficitu (Sucho) v době 1 – 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 10$). Čísla pod značkami reprezentujícími průměrné hodnoty příslušného parametru uvádějí statistickou průkaznost (p) rozdílů mezi kontrolními a stresovanými rostlinami. r.j. ... relativní jednotky.



Obr. 6. Vybrané charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu (γ RC ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, ABS/RC ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, TP_0 /RC ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, ET_0 /RC ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, RE_0 /RC ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, DI_0 /RC ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, PI_{ABS} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q_B , PI_{TOTAL} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI) u inbrední linie kukuřice 2023 pěstované v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavené vodnímu deficitu (Sucho) v době 1 – 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 10$). Čísla pod značkami reprezentujícími průměrné hodnoty příslušného parametru uvádějí statistickou průkaznost (p) rozdílu mezi kontrolními a stresovanými rostlinami. r.j. ... relativní jednotky.



Obr. 7. Časová závislost (OJIP křivka) fluorescence chlorofylu (F_t), křivky diferenční kinetiky v oblasti mezi inflexními body O a I (ΔW_{OI}), O a J (ΔW_{OJ}), O a K (ΔW_{OK}), relativní variabilní fluorescence chlorofylu mezi body I a P s maximální amplitudou fixovanou jako 1 (W_{IP}) a část křivky relativní variabilní fluorescence chlorofylu mezi body O a I s hodnotami vyššími než 1 (W_{OI}) u inbrední linie kukuřice 2023 pěstované v podmínkách dostatku vody (K) nebo vystavené vodnímu deficitu (S) v době 1 – 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ($n = 10$).



4.3. Experimentální celek 3

V tomto pokusném celku jsem hodnotila soubor 25 inbredních linií kukuřice, vystavených šestidennímu nebo desetidennímu období bez zalévání, a to za účelem stanovení indexů odolnosti/citlivosti k suchu. Tyto indexy jsem primárně počítala na základě charakteristik souvisejících s tvorbou biomasy (DMS, DMR, DMT). Zároveň jsem měřila i některé nedestruktivní parametry (charakteristiky výměny plynů, parametry JIP testu odvozeného z OJIP křivky indukce fluorescence Chl a indexy spektrální odrazivosti NDVI a PRI) a zajímalo mě, zda indexy odolnosti/citlivosti k suchu vypočítané z těchto parametrů budou korelovat s indexy stanovenými na základě produkce biomasy. Konečným cílem tohoto celku byl výběr dvou kontrastních genotypů vhodných pro další detailnější analýzy v rámci experimentálních celků 4 a 5.

Absolutní hodnoty měřených charakteristik pro všech 25 analyzovaných linií a obě periody pěstování jsou uvedeny v **Příloze 1**. ANOVA dvojnásobného třídění prokázala, že mezi studovanými genotypy, stejně jako mezi kontrolními a stresovanými rostlinami, existují statisticky průkazné rozdíly (výjimkou byl pouze neprůkazný vliv způsobu pěstování – kontrola/sucho – u parametru TP_0/RC v případě šestidenního stresu suchem a u parametrů WUE a ψ_{RE0} v případě desetidenního stresu suchem (**Tab. 16**). Rovněž efekt interakcí genotyp×pěstování byl většinou statisticky významný, což znamenalo, že různé genotypy reagovaly na stres suchem různým způsobem. To platilo především pro desetidenní sucho; v případě šestidenního sucha nebyl tento zdroj variability u řady charakteristik statisticky průkazný (**Tab. 16**).

Korelační analýza ukázala, že kromě očekávaných korelací mezi charakteristikami počítanými ze společných základních hodnot (tj. např. mezi P_N , E či g_S a WUE či WUE_i , mezi různými parametry JIP testu nebo mezi DMS či DMR a DMT) existují v analyzovaném genotypovém souboru i další statisticky průkazné vztahy; větší množství těchto korelací jsem přitom zaznamenala u rostlin vystavených vodnímu deficitu po dobu 10 dnů než u rostlin stresovaných pouze šestidenním suchem (**Tab. 17, Příloha 1**). Nalezla jsem např. silnou statisticky průkaznou pozitivní korelaci mezi všemi parametry hmotnosti sušiny a mezi g_S či E, o něco méně korelovaly tyto parametry i s P_N , NDVI, ϕ_{RE0} a PI_{TOTAL} . P_N také pozitivně korelovala s E, oběma indexy spektrální odrazivosti, parametry fluorescence Chl souvisejícími především s ději v PSII a oběma performančními indexy, a naopak negativně s parametry fluorescence Chl souvisejícími s disipací přebytké energie. Totéž (byť v menší míře) platilo i pro E. Ani v jedné periodě sucha však P_N nekorelovala s g_S (na rozdíl od přítomnosti pozitivního vztahu mezi g_S a E). Indexy PRI a NDVI pozitivně korelovaly jak mezi sebou, tak s většinou parametrů fluorescence Chl; negativní korelace jsem pozorovala opět s parametry popisujícími disipaci energie ve světlosběrných anténách PSII. V podmínkách krátkodobějšího vystavení rostlin suchu koreloval parametr PRI pozitivně i s P_N , WUE či WUE_i , ale na rozdíl od desetidenního sucha nikoli s parametry JIP testu (**Tab. 17, Příloha 1**).

Na základě indexů TOL a SSI vypočítaných z charakteristik souvisejících s tvorbou biomasy se jako genotyp nejvíce citlivý k suchu ukázala v rámci hodnoceného souboru především inbrední linie 2023, případně 2021, a to jak při mírnějším, šestidenním stresu suchem, tak při vystavení vodnímu deficitu po dobu 10 dnů. Naopak nejmenší citlivost k suchu vykazovaly inbrední linie CE704, 2022 a CE7010, a dále také linie 2126 (**Tab. 18**). Jako vhodné kontrastní linie pro další detailnější analýzu jsem vybrala linie 2023 a CE704, a to jednak na základě výše uvedených výsledků, jednak proto, že obě byly součástí i genotypového souboru analyzovaného v rámci experimentálního celku 1 a bylo u nich k dispozici i osivo obou jejich F1 kříženců.

Když byly indexy TOL a SSI vypočítány z charakteristik souvisejících s výměnou plynů v listech, ukázala se jako citlivá k suchu zejména linie 2023 (v případě P_N i CE7032) a naopak jako odolná k suchu linie CE704 (P_N , WUE_i , případně i WUE), ale i linie 2022 (P_N), 2404 (WUE_i , případně i WUE) (**Tab. 19, 20**). Jiná situace byla u TOL a SSI vypočítaných z indexů spektrální odrazivosti – v případě PRI vykazovaly citlivost k suchu především inbrední linie 2030 a 2187 a odolnost linie 2126, 2472, 2509 a CE7032, v případě NDVI byly citlivé linie 2124 a 2412 a odolné linie 2472 a CE7032 (**Tab. 21**). Pořadí linií na základě jejich citlivosti/odolnosti k suchu se změnilo i u TOL a SSI indexů počítaných na základě různých parametrů JIP testu: dobrou odolnost by podle těchto indexů měly vykazovat linie 2124 (ale při výpočtu na základě parametrů ϕ_{RE0} a ψ_{RE0} by tato linie měla být spíše citlivá k suchu), 2509, případně 2608, CE7032 nebo CE60018, zatímco větší citlivost k suchu by měla být charakteristická pro linie 2087, 2630, 2472 nebo 2629 (**Tab. 22-27**).

Tab. 16. Analýza variance vybraných morfologických a fyziologických charakteristik v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody. Jako možné zdroje variability byly zahrnuty rozdíly mezi genotypy (G), mezi způsobem pěstování (P) a jejich interakce (G×P). Uvedeny jsou hladiny statistické významnosti (p), statisticky průkazné rozdíly jsou zvýrazněny silně. DMS ...hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ...hmotnost sušiny kořenů rostlin, DMT ... hmotnost sušiny celých rostlin, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, E ... rychlost transpirace, g_s ... vodivost průduchů, WUE ... „okamžitá“ efektivita využití vody, WUE_i ... „vnitřní“ efektivita využití vody, PRI ... fotochemický reflektanční index, NDVI ... normalizovaný diferenční vegetační index, Q_Y ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u světelně adaptovaných listů; charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaných listů: ϕ_{P0} ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, ϕ_{E0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B, ϕ_{RE0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, ϕ_{D0} ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie, ψ_{E0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B, ψ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, δ_{RE0} ... účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, γ_{RC} ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, ABS/RC ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, TP₀/RC ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, ET₀/RC ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, RE₀/RC ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, DI₀/RC ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, PI_{ABS} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q_B, PI_{TOTAL} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI.

| Charakteristika | 6 dnů | | | 10 dnů | | |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | G | P | G×P | G | P | G×P |
| DMS | < 0,001 | < 0,001 | 0,94 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| DMR | < 0,001 | < 0,01 | 0,98 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| DMT | < 0,001 | 0,02 | 0,97 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| P _N | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| g _s | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| E | < 0,001 | < 0,001 | 0,01 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| WUE | < 0,001 | 0,03 | < 0,001 | < 0,001 | 0,07 | < 0,001 |
| WUE _i | < 0,001 | 0,01 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| PRI | < 0,001 | < 0,001 | 0,04 | < 0,01 | < 0,001 | 0,03 |
| NDVI | < 0,001 | < 0,001 | 0,08 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| Q _Y | < 0,001 | < 0,001 | < 0,01 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ϕ_{P0} | < 0,001 | < 0,001 | 0,16 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ϕ_{E0} | < 0,001 | < 0,001 | 0,01 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ϕ_{RE0} | < 0,001 | < 0,001 | 0,13 | < 0,001 | < 0,001 | 0,02 |
| ϕ_{D0} | < 0,001 | < 0,001 | 0,16 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ψ_{E0} | < 0,001 | < 0,001 | 0,02 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ψ_{RE0} | < 0,001 | < 0,001 | 0,08 | < 0,001 | 0,14 | 0,01 |
| δ_{RE0} | < 0,001 | 0,02 | 0,01 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| γ_{RC} | < 0,001 | < 0,001 | 0,04 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ABS/RC | < 0,001 | < 0,01 | 0,20 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| TP ₀ /RC | < 0,001 | 0,18 | 0,04 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| ET ₀ /RC | < 0,001 | < 0,001 | 0,04 | < 0,001 | < 0,01 | < 0,001 |
| RE ₀ /RC | < 0,001 | < 0,001 | 0,06 | < 0,001 | 0,01 | < 0,001 |
| DI ₀ /RC | < 0,001 | < 0,001 | 0,42 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| PI _{ABS} | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| PI _{TOTAL} | < 0,001 | < 0,001 | 0,06 | 0,02 | < 0,001 | 0,11 |

Tab. 17. Schematické znázornění korelací mezi vybranými morfologickými a fyziologickými charakteristikami analyzovanými v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6 dnů (v levé dolní části tabulky), resp. 10 dnů (v pravé horní části tabulky) od začátku stresové periody. Vysvětlení barevné symboliky je uvedeno na konci tabulky. DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin, DMT ... hmotnost sušiny celých rostlin, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, E ... rychlost transpirace, g_s ... vodivost průduchů, WUE ... „okamžitá“ efektivita využití vody, WUE_i ... „vnitřní“ efektivita využití vody, PRI ... fotochemický reflektanční index, NDVI ... normalizovaný diferenční vegetační index, Q_Y ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u světelně adaptovaných listů; charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaných listů: Φ_{P0} ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, Φ_{E0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B , Φ_{RE0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, Φ_{D0} ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie, Ψ_{E0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B , Ψ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, δ_{RE0} ... účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, γ_{RC} ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, ABS/RC ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, TP_0/RC ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, ET_0/RC ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, RE_0/RC ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, DI_0/RC ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, PI_{ABS} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q_B , PI_{TOTAL} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI.

| Charakteristika | DMS | DMR | DMT | P_N | g_s | E | WUE | WUE_i | PRI | NDVI | Q_Y | Φ_{P0} | Φ_{E0} | Φ_{RE0} | Φ_{D0} | Ψ_{E0} | Ψ_{RE0} | δ_{RE0} | γ_{RC} | ABS/RC | TP_0/RC | ET_0/RC | RE_0/RC | DI_0/RC | PI_{ABS} | PI_{TOTAL} |
|-----------------|-----|-----|-----|-------|-------|-----|-----|---------|-----|------|-------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|----------------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|--------------|
| DMS | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DMR | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DMT | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P_N | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| g_s | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WUE | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WUE_i | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PRI | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NDVI | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q_Y | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | |
| Φ_{P0} | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | |
| Φ_{E0} | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | |
| Φ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | |
| Φ_{D0} | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | |
| Ψ_{E0} | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | |
| Ψ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | |
| δ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | |
| γ_{RC} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | |
| ABS/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | |
| TP_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | |
| ET_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | |
| RE_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | |
| DI_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | |
| PI_{ABS} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | |
| PI_{TOTAL} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × |

Statistická průkaznost Pearsonova korelačního koeficientu:

| Pozitivní korelace | | | Negativní korelace | | |
|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------|
| $p < 0,001$ | $p = (0,001; 0,01)$ | $p = (0,01; 0,05)$ | $p = (0,01; 0,05)$ | $p = (0,001; 0,01)$ | $p < 0,001$ |

Tab. 18. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě hmotnosti sušiny nadzemní části rostlin (DMS), hmotnosti sušiny kořenů rostlin (DMR) nebo hmotnosti sušiny celých rostlin (DMT), stanovených v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | DMS | | | | DMR | | | | DMT | | | |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,208 | 1,072 | 0,991 | 0,999 | -0,100 | 0,758 | 2,682 | 0,938 | 0,109 | 1,830 | 0,694 | 0,973 |
| 2022 | -0,133 | 0,480 | -0,842 | 0,821 | -0,267 | 0,174 | 5,723 | 0,441 | -0,400 | 0,654 | -3,082 | 0,667 |
| 2023 | 0,564 | 1,896 | 1,822 | 1,254 | -0,040 | 1,768 | 0,654 | 1,409 | 0,524 | 3,664 | 2,238 | 1,325 |
| 2030 | 0,291 | 0,760 | 1,028 | 0,989 | -0,043 | 0,800 | 0,718 | 1,228 | 0,248 | 1,560 | 1,141 | 1,099 |
| 2087 | 0,193 | 1,112 | 0,730 | 0,968 | -0,044 | 0,962 | 0,540 | 1,052 | 0,149 | 2,074 | 0,679 | 1,006 |
| 2121 | 0,537 | 1,636 | 1,861 | 1,034 | 0,001 | 1,250 | -0,021 | 1,027 | 0,539 | 2,886 | 2,386 | 1,031 |
| 2124 | 0,503 | 1,458 | 1,624 | 0,930 | -0,045 | 1,260 | 0,698 | 1,011 | 0,458 | 2,718 | 1,927 | 0,966 |
| 2126 | -0,037 | 0,696 | -0,191 | 1,050 | -0,140 | 0,232 | 3,609 | 0,546 | -0,177 | 0,928 | -1,194 | 0,852 |
| 2187 | -0,138 | 0,978 | -0,556 | 1,083 | -0,082 | 1,026 | 1,900 | 1,328 | -0,220 | 2,004 | -1,195 | 1,197 |
| 2232 | -0,106 | 0,560 | -0,667 | 0,967 | -0,076 | 0,428 | 2,707 | 0,963 | -0,182 | 0,988 | -1,535 | 0,965 |
| 2404 | 0,069 | 1,470 | 0,216 | 1,120 | -0,041 | 1,032 | 0,718 | 1,048 | 0,028 | 2,502 | 0,118 | 1,089 |
| 2412 | 0,332 | 0,620 | 1,223 | 1,080 | -0,008 | 0,412 | 0,121 | 0,974 | 0,324 | 1,032 | 1,525 | 1,035 |
| 2472 | 0,259 | 2,206 | 1,022 | 1,010 | -0,144 | 1,654 | 3,166 | 0,989 | 0,116 | 3,860 | 0,611 | 1,001 |
| 2509 | 0,606 | 0,824 | 2,227 | 0,887 | -0,009 | 0,504 | 0,195 | 0,743 | 0,596 | 1,328 | 2,950 | 0,826 |
| 2550 | 0,556 | 0,694 | 1,783 | 0,967 | -0,013 | 0,764 | 0,167 | 1,240 | 0,542 | 1,458 | 2,182 | 1,094 |
| 2608 | 0,624 | 0,628 | 2,608 | 1,008 | 0,029 | 0,206 | -0,591 | 0,513 | 0,653 | 0,834 | 3,570 | 0,813 |
| 2629 | 0,390 | 1,118 | 1,238 | 1,028 | 0,052 | 0,688 | -0,578 | 0,871 | 0,442 | 1,806 | 1,724 | 0,961 |
| 2630 | 0,256 | 0,582 | 0,945 | 1,079 | -0,062 | 0,546 | 0,916 | 1,234 | 0,193 | 1,128 | 0,902 | 1,149 |
| 2638 | 0,433 | 0,770 | 1,574 | 1,026 | -0,052 | 0,642 | 0,682 | 1,085 | 0,381 | 1,412 | 1,711 | 1,052 |
| CE704 | -0,026 | 0,238 | -0,120 | 0,522 | -0,119 | 0,382 | 1,886 | 0,946 | -0,145 | 0,620 | -0,810 | 0,721 |
| CE7010 | 0,006 | 0,606 | 0,031 | 0,656 | -0,095 | 0,318 | 2,364 | 0,476 | -0,089 | 0,924 | -0,640 | 0,580 |
| CE7011 | -0,029 | 1,788 | -0,233 | 0,970 | -0,046 | 1,368 | 2,104 | 0,965 | -0,075 | 3,156 | -0,814 | 0,968 |
| CE7032 | 0,256 | 1,212 | 2,130 | 1,083 | 0,031 | 1,014 | -1,045 | 1,144 | 0,287 | 2,226 | 3,024 | 1,110 |
| CE7037 | 0,416 | 1,852 | 1,417 | 0,971 | -0,026 | 1,428 | 0,382 | 0,971 | 0,390 | 3,280 | 1,698 | 0,971 |
| CE60018 | 0,064 | 0,786 | 0,317 | 1,138 | -0,030 | 0,450 | 0,802 | 0,921 | 0,034 | 1,236 | 0,224 | 1,047 |

Tab. 19. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě čisté rychlosti fotosyntézy (P_N), vodivosti průduchů (g_s) a rychlosti transpirace (E), stanovených v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | P_N | | | | g_s | | | | E | | | |
|----------------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 3,370 | 5,879 | 0,947 | 1,018 | 0,017 | 0,054 | 1,105 | 1,337 | 0,403 | 0,910 | 0,951 | 0,915 |
| 2022 | 2,033 | 3,157 | 0,676 | 0,771 | 0,017 | 0,017 | 1,136 | 0,944 | 0,385 | 0,672 | 1,003 | 1,006 |
| 2023 | 6,889 | 9,235 | 1,721 | 1,491 | -0,023 | 0,024 | -2,630 | 0,758 | -0,324 | 0,969 | -1,215 | 1,150 |
| 2030 | 3,076 | 5,387 | 0,935 | 1,004 | 0,021 | 0,032 | 1,148 | 1,169 | 0,503 | 1,062 | 1,039 | 1,163 |
| 2087 | 2,254 | 3,818 | 0,936 | 0,957 | 0,021 | 0,021 | 1,004 | 1,094 | 0,451 | 0,594 | 1,318 | 0,952 |
| 2121 | 2,553 | 5,076 | 0,915 | 0,977 | 0,018 | 0,018 | 1,115 | 0,856 | 0,533 | 0,696 | 1,054 | 0,949 |
| 2124 | 2,853 | 5,013 | 0,982 | 0,921 | 0,029 | 0,023 | 1,085 | 0,875 | 0,474 | 0,942 | 0,901 | 1,017 |
| 2126 | 3,123 | 5,637 | 0,946 | 1,044 | 0,011 | 0,019 | 0,892 | 0,986 | 0,306 | 0,717 | 0,867 | 1,022 |
| 2187 | 2,335 | 3,992 | 0,935 | 1,115 | 0,022 | 0,022 | 1,200 | 1,048 | 0,448 | 0,622 | 1,185 | 1,167 |
| 2232 | 3,065 | 5,324 | 0,911 | 0,960 | 0,018 | 0,024 | 1,167 | 1,018 | 0,342 | 0,862 | 0,879 | 1,061 |
| 2404 | 3,543 | 7,124 | 0,947 | 1,167 | 0,015 | 0,023 | 1,529 | 1,475 | 0,405 | 0,477 | 1,395 | 0,982 |
| 2412 | 2,878 | 5,078 | 0,916 | 1,109 | 0,010 | 0,020 | 0,892 | 1,194 | 0,582 | 0,473 | 1,572 | 0,905 |
| 2472 | 3,121 | 5,612 | 0,908 | 1,023 | 0,021 | 0,006 | 1,168 | 0,256 | 0,385 | 0,585 | 0,897 | 0,759 |
| 2509 | 2,314 | 3,937 | 1,193 | 0,864 | 0,015 | 0,008 | 1,911 | 0,353 | 0,216 | 1,029 | 1,076 | 1,069 |
| 2550 | 2,740 | 4,430 | 0,967 | 0,966 | 0,014 | 0,022 | 1,055 | 1,058 | 0,302 | 0,643 | 0,917 | 0,970 |
| 2608 | 2,547 | 4,311 | 0,948 | 0,992 | 0,009 | 0,018 | 1,079 | 1,227 | 0,262 | 0,446 | 1,057 | 0,959 |
| 2629 | 2,752 | 4,732 | 0,981 | 1,023 | 0,011 | 0,020 | 1,070 | 1,007 | 0,288 | 0,610 | 1,039 | 0,944 |
| 2630 | 2,901 | 5,199 | 1,026 | 1,111 | 0,016 | 0,053 | 1,137 | 1,311 | 0,333 | 0,836 | 0,968 | 1,082 |
| 2638 | 2,286 | 3,900 | 0,953 | 1,036 | 0,020 | 0,028 | 1,241 | 0,921 | 0,351 | 0,703 | 0,953 | 1,078 |
| CE704 | 1,158 | 2,110 | 0,463 | 0,448 | 0,013 | 0,045 | 1,049 | 1,120 | 0,473 | 0,863 | 1,291 | 0,832 |
| CE7010 | 1,915 | 2,993 | 0,950 | 0,586 | 0,023 | 0,011 | 1,070 | 0,447 | 0,532 | 0,783 | 1,386 | 0,885 |
| CE7011 | 3,095 | 5,387 | 0,928 | 0,961 | 0,021 | 0,022 | 1,106 | 0,894 | 0,571 | 0,773 | 1,176 | 0,912 |
| CE7032 | 6,927 | 5,798 | 1,542 | 1,131 | 0,008 | 0,022 | 0,367 | 1,181 | 0,362 | 0,899 | 0,749 | 1,244 |
| CE7037 | 2,655 | 4,412 | 0,926 | 0,958 | 0,028 | 0,036 | 1,044 | 1,928 | 0,484 | 0,745 | 1,213 | 1,046 |
| CE60018 | 3,168 | 5,745 | 0,932 | 1,190 | 0,020 | 0,009 | 1,199 | 0,503 | 0,373 | 0,312 | 0,905 | 0,948 |

Tab. 20. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě „okamžité“ efektivity využití vody (WUE) a „vnitřní“ efektivity využití vody (WUE_i), stanovených v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | WUE | | | | WUE _i | | | |
|----------------|--------|--------|--------|--------|------------------|----------|--------|--------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,296 | 0,259 | 0,911 | -0,983 | 0,096 | -4,984 | 0,009 | -0,691 |
| 2022 | -0,413 | -1,130 | -1,343 | 4,054 | -14,927 | 4,789 | -1,633 | 0,414 |
| 2023 | 7,882 | 0,875 | 13,702 | -2,693 | 262,521 | 68,361 | 13,466 | 6,863 |
| 2030 | 0,236 | -0,780 | 0,808 | 2,630 | -0,890 | -1,220 | -0,104 | -0,111 |
| 2087 | -0,592 | -0,254 | -2,141 | 0,887 | 1,890 | 7,724 | 0,391 | 0,713 |
| 2121 | -0,027 | -0,135 | -0,118 | 0,424 | -2,510 | 32,796 | -0,327 | 2,604 |
| 2124 | 0,188 | -0,552 | 0,840 | 2,045 | 1,381 | 14,923 | 0,294 | 1,438 |
| 2126 | 0,324 | -0,196 | 0,906 | 0,570 | 15,426 | 28,288 | 1,359 | 1,997 |
| 2187 | -0,371 | -4,046 | -1,208 | 11,406 | -21,815 | 21,065 | -3,390 | 2,356 |
| 2232 | 0,189 | -0,803 | 0,570 | 2,613 | -5,593 | 13,367 | -0,572 | 1,117 |
| 2404 | -0,800 | 0,966 | -1,471 | -1,672 | -77,006 | -26,980 | -4,659 | -1,344 |
| 2412 | -1,388 | 0,814 | -4,117 | -2,069 | 10,954 | 18,698 | 0,926 | 1,336 |
| 2472 | 0,280 | 0,439 | 0,892 | -1,374 | -6,955 | 46,292 | -0,845 | 3,569 |
| 2509 | 0,629 | -0,868 | 1,696 | 3,860 | 7,119 | 27,391 | 0,548 | 2,687 |
| 2550 | 0,358 | -0,344 | 1,085 | 1,123 | 5,550 | 11,018 | 0,591 | 0,959 |
| 2608 | -0,059 | -0,082 | -0,139 | 0,194 | 6,556 | 4,849 | 0,488 | 0,306 |
| 2629 | 0,283 | 0,038 | 0,708 | -0,119 | 4,028 | 20,867 | 0,347 | 1,765 |
| 2630 | 0,346 | -0,661 | 1,100 | 2,354 | 5,433 | 3,327 | 0,608 | 0,566 |
| 2638 | 0,183 | -0,407 | 0,729 | 1,541 | -5,369 | 14,768 | -0,843 | 2,376 |
| CE704 | -1,237 | -0,836 | -4,445 | 3,845 | -18,690 | -24,019 | -1,980 | -3,936 |
| CE7010 | 0,260 | -1,231 | 1,056 | 4,703 | 0,551 | 20,717 | 0,133 | 1,944 |
| CE7011 | -0,159 | 0,016 | -0,582 | -0,053 | -2,209 | 21,527 | -0,292 | 1,889 |
| CE7032 | 2,326 | -0,830 | 6,401 | 2,504 | 76,834 | 22,075 | 8,215 | 1,559 |
| CE7037 | -0,797 | -0,021 | -2,752 | 0,065 | 0,676 | -120,744 | 0,147 | -9,492 |
| CE60018 | 0,344 | 1,529 | 1,060 | -2,327 | -7,624 | 60,897 | -0,882 | 4,480 |

Tab. 21. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě fotochemického reflektančního indexu (PRI) a normalizovaného diferenčního vegetačního indexu (NDVI), stanovených v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | PRI | | | | NDVI | | | |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | -0,002 | 0,015 | -0,632 | 0,785 | 0,027 | 0,037 | 0,998 | 0,527 |
| 2022 | -0,001 | 0,012 | -0,245 | 0,617 | -0,007 | 0,091 | -0,285 | 1,297 |
| 2023 | 0,001 | 0,029 | 0,326 | 1,239 | 0,028 | 0,089 | 1,007 | 1,245 |
| 2030 | -0,003 | 0,008 | -0,816 | 0,440 | -0,006 | 0,039 | -0,225 | 0,563 |
| 2087 | 0,007 | 0,030 | 1,746 | 1,374 | 0,042 | 0,171 | 1,508 | 2,370 |
| 2121 | 0,000 | 0,004 | -0,005 | 0,221 | 0,009 | 0,035 | 0,349 | 0,495 |
| 2124 | 0,001 | 0,010 | 0,180 | 0,556 | -0,008 | 0,024 | -0,307 | 0,346 |
| 2126 | 0,011 | 0,037 | 2,876 | 1,699 | 0,068 | 0,093 | 2,432 | 1,307 |
| 2187 | -0,005 | 0,002 | -1,516 | 0,118 | 0,000 | 0,059 | -0,004 | 0,829 |
| 2232 | 0,006 | 0,029 | 1,577 | 1,426 | 0,045 | 0,032 | 1,677 | 0,462 |
| 2404 | 0,006 | 0,029 | 1,442 | 1,375 | 0,014 | 0,093 | 0,506 | 1,297 |
| 2412 | 0,001 | 0,012 | 0,143 | 0,606 | -0,004 | 0,024 | -0,157 | 0,339 |
| 2472 | 0,012 | 0,030 | 2,982 | 1,549 | 0,089 | 0,098 | 3,222 | 1,391 |
| 2509 | 0,021 | 0,030 | 5,493 | 1,602 | 0,083 | 0,081 | 3,189 | 1,205 |
| 2550 | 0,006 | 0,033 | 1,591 | 1,766 | 0,050 | 0,101 | 1,890 | 1,471 |
| 2608 | 0,001 | 0,007 | 0,338 | 0,335 | 0,016 | 0,049 | 0,603 | 0,703 |
| 2629 | 0,003 | 0,021 | 0,803 | 1,045 | 0,043 | 0,102 | 1,590 | 1,470 |
| 2630 | 0,004 | 0,015 | 0,983 | 0,795 | 0,029 | 0,078 | 1,058 | 1,137 |
| 2638 | 0,005 | 0,014 | 1,160 | 0,674 | 0,056 | 0,050 | 2,055 | 0,715 |
| CE704 | 0,006 | 0,022 | 1,441 | 1,004 | 0,011 | 0,078 | 0,401 | 1,096 |
| CE7010 | 0,003 | 0,013 | 0,855 | 0,706 | 0,035 | 0,062 | 1,294 | 0,883 |
| CE7011 | -0,002 | 0,017 | -0,515 | 0,984 | 0,001 | 0,021 | 0,052 | 0,306 |
| CE7032 | 0,019 | 0,037 | 5,031 | 1,908 | 0,064 | 0,127 | 2,438 | 1,852 |
| CE7037 | -0,004 | 0,020 | -1,054 | 1,028 | -0,013 | 0,052 | -0,476 | 0,728 |
| CE60018 | -0,001 | 0,017 | -0,235 | 0,904 | 0,006 | 0,065 | 0,224 | 0,920 |

Tab. 22. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě parametrů fluorescence chlorofylu měřených na světelně adaptovaných listech (maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII ... Q_Y) nebo temnotně adaptovaných listech (maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII ... Φ_{P0} ; kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B ... Φ_{E0}) v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | Q_Y | | | | Φ_{P0} | | | | Φ_{E0} | | | |
|----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,024 | 0,190 | 1,748 | 1,267 | 0,016 | 0,097 | 0,832 | 1,100 | 0,030 | 0,099 | 0,925 | 1,143 |
| 2022 | 0,009 | 0,121 | 0,703 | 0,798 | 0,033 | 0,099 | 1,751 | 1,147 | 0,033 | 0,104 | 1,122 | 1,298 |
| 2023 | 0,029 | 0,201 | 2,105 | 1,364 | 0,019 | 0,135 | 0,953 | 1,523 | 0,041 | 0,145 | 1,245 | 1,676 |
| 2030 | 0,031 | 0,134 | 2,306 | 0,947 | 0,039 | 0,133 | 2,084 | 1,558 | 0,036 | 0,108 | 1,198 | 1,337 |
| 2087 | 0,044 | 0,228 | 3,155 | 1,492 | 0,034 | 0,154 | 1,766 | 1,734 | 0,074 | 0,205 | 2,351 | 2,387 |
| 2121 | 0,016 | 0,085 | 1,199 | 0,577 | 0,020 | 0,057 | 1,071 | 0,656 | 0,032 | 0,050 | 1,038 | 0,610 |
| 2124 | -0,058 | 0,025 | -4,889 | 0,197 | -0,041 | 0,028 | -2,372 | 0,347 | -0,015 | 0,026 | -0,533 | 0,341 |
| 2126 | 0,074 | 0,193 | 5,518 | 1,285 | 0,025 | 0,106 | 1,407 | 1,267 | 0,029 | 0,099 | 0,963 | 1,193 |
| 2187 | -0,018 | 0,059 | -1,397 | 0,410 | 0,014 | 0,045 | 0,761 | 0,535 | 0,018 | 0,038 | 0,612 | 0,484 |
| 2232 | 0,019 | 0,108 | 1,346 | 0,717 | 0,021 | 0,054 | 1,083 | 0,621 | 0,026 | 0,048 | 0,865 | 0,572 |
| 2404 | -0,002 | 0,176 | -0,152 | 1,187 | 0,020 | 0,082 | 1,046 | 0,952 | 0,025 | 0,080 | 0,865 | 1,011 |
| 2412 | 0,001 | 0,130 | 0,078 | 0,874 | 0,008 | 0,047 | 0,416 | 0,545 | 0,025 | 0,048 | 0,756 | 0,563 |
| 2472 | 0,034 | 0,158 | 2,606 | 1,136 | 0,043 | 0,128 | 2,274 | 1,499 | 0,055 | 0,115 | 1,739 | 1,355 |
| 2509 | -0,015 | 0,093 | -1,138 | 0,655 | -0,007 | 0,015 | -0,390 | 0,182 | 0,008 | 0,010 | 0,270 | 0,125 |
| 2550 | -0,018 | 0,135 | -1,385 | 0,926 | -0,010 | 0,076 | -0,560 | 0,865 | 0,012 | 0,074 | 0,409 | 0,872 |
| 2608 | 0,005 | 0,052 | 0,395 | 0,354 | 0,043 | 0,053 | 2,211 | 0,609 | 0,034 | 0,044 | 1,079 | 0,510 |
| 2629 | 0,049 | 0,361 | 3,681 | 2,520 | 0,031 | 0,119 | 1,712 | 1,419 | 0,049 | 0,122 | 1,647 | 1,496 |
| 2630 | 0,010 | 0,231 | 0,739 | 1,526 | 0,030 | 0,114 | 1,517 | 1,264 | 0,048 | 0,166 | 1,440 | 1,827 |
| 2638 | 0,059 | 0,125 | 4,477 | 0,856 | 0,034 | 0,110 | 1,793 | 1,240 | 0,041 | 0,089 | 1,295 | 1,005 |
| CE704 | 0,023 | 0,194 | 1,716 | 1,331 | 0,010 | 0,092 | 0,554 | 1,074 | 0,021 | 0,072 | 0,726 | 0,909 |
| CE7010 | 0,003 | 0,073 | 0,219 | 0,484 | 0,008 | 0,051 | 0,403 | 0,578 | 0,018 | 0,058 | 0,578 | 0,658 |
| CE7011 | 0,013 | 0,193 | 0,939 | 1,277 | 0,024 | 0,138 | 1,242 | 1,564 | 0,031 | 0,108 | 0,978 | 1,245 |
| CE7032 | -0,008 | 0,072 | -0,624 | 0,503 | -0,002 | 0,051 | -0,096 | 0,604 | 0,017 | 0,045 | 0,601 | 0,570 |
| CE7037 | 0,000 | 0,207 | 0,005 | 1,402 | 0,021 | 0,104 | 1,104 | 1,203 | 0,041 | 0,066 | 1,378 | 0,853 |
| CE60018 | 0,009 | 0,122 | 0,680 | 0,797 | 0,038 | 0,070 | 1,928 | 0,786 | 0,036 | 0,062 | 1,132 | 0,714 |

Tab. 23. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě parametrů fluorescence chlorofylu měřených na temnotně adaptovaných listech (kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI ... Φ_{RE0} ; kvantový výtěžek disipace zachycené energie ... Φ_{D0}) v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | Φ_{RE0} | | | | Φ_{D0} | | | |
|----------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,011 | 0,008 | 0,495 | 0,260 | -0,016 | -0,097 | 0,952 | 1,200 |
| 2022 | 0,037 | 0,059 | 1,602 | 2,223 | -0,033 | -0,099 | 1,684 | 1,161 |
| 2023 | 0,036 | 0,046 | 1,404 | 1,442 | -0,019 | -0,135 | 1,109 | 1,740 |
| 2030 | 0,020 | 0,038 | 0,924 | 1,381 | -0,039 | -0,133 | 2,140 | 1,488 |
| 2087 | 0,029 | 0,034 | 1,310 | 1,212 | -0,034 | -0,154 | 2,006 | 1,979 |
| 2121 | 0,009 | 0,007 | 0,395 | 0,227 | -0,020 | -0,057 | 1,142 | 0,684 |
| 2124 | 0,061 | 0,056 | 2,312 | 1,728 | 0,041 | -0,028 | -1,760 | 0,263 |
| 2126 | 0,017 | 0,033 | 0,704 | 1,145 | -0,025 | -0,106 | 1,158 | 1,111 |
| 2187 | 0,034 | 0,064 | 1,576 | 2,265 | -0,014 | -0,045 | 0,729 | 0,500 |
| 2232 | 0,018 | 0,016 | 0,993 | 0,679 | -0,021 | -0,054 | 1,167 | 0,645 |
| 2404 | 0,008 | 0,007 | 0,470 | 0,306 | -0,020 | -0,082 | 1,071 | 0,933 |
| 2412 | 0,033 | 0,032 | 1,509 | 1,183 | -0,008 | -0,047 | 0,447 | 0,545 |
| 2472 | 0,002 | 0,048 | 0,094 | 1,544 | -0,043 | -0,128 | 2,335 | 1,417 |
| 2509 | 0,021 | 0,029 | 0,880 | 0,982 | 0,007 | -0,015 | -0,299 | 0,140 |
| 2550 | 0,032 | 0,017 | 1,364 | 0,627 | 0,010 | -0,076 | -0,506 | 0,910 |
| 2608 | 0,005 | 0,006 | 0,272 | 0,273 | -0,043 | -0,053 | 2,449 | 0,649 |
| 2629 | 0,029 | 0,034 | 1,279 | 1,192 | -0,031 | -0,119 | 1,537 | 1,253 |
| 2630 | 0,019 | 0,049 | 0,881 | 1,706 | -0,030 | -0,114 | 1,920 | 1,573 |
| 2638 | 0,020 | 0,002 | 0,865 | 0,078 | -0,034 | -0,110 | 1,765 | 1,392 |
| CE704 | 0,015 | 0,001 | 0,760 | 0,046 | -0,010 | -0,092 | 0,547 | 1,045 |
| CE7010 | 0,018 | 0,021 | 0,845 | 0,782 | -0,008 | -0,051 | 0,420 | 0,620 |
| CE7011 | 0,039 | 0,032 | 1,709 | 1,138 | -0,024 | -0,138 | 1,370 | 1,720 |
| CE7032 | 0,016 | 0,038 | 0,721 | 1,325 | 0,002 | -0,051 | -0,079 | 0,547 |
| CE7037 | 0,014 | 0,016 | 0,662 | 0,652 | -0,021 | -0,104 | 1,157 | 1,213 |
| CE60018 | 0,006 | -0,004 | 0,281 | -0,157 | -0,038 | -0,070 | 2,247 | 0,907 |

Tab. 24. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě parametrů fluorescence chlorofylu měřených na temnotně adaptovaných listech (účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B ... Ψ_{E0} ; účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI ... Ψ_{RE0} ; účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI ... δ_{RE0}) **v souboru 25 inbredních linií kukuřice** pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu **po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody**. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | Ψ_{E0} | | | | Ψ_{RE0} | | | | δ_{RE0} | | | |
|----------------|-------------|--------|-------|--------|--------------|--------|--------|--------|----------------|--------|--------|--------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,027 | 0,070 | 0,960 | 1,209 | 0,009 | -0,030 | 0,388 | -4,387 | -0,008 | -0,148 | -0,509 | 2,769 |
| 2022 | 0,020 | 0,086 | 0,775 | 1,593 | 0,035 | 0,053 | 1,441 | 8,453 | 0,047 | 0,007 | 2,583 | -0,135 |
| 2023 | 0,039 | 0,112 | 1,380 | 1,966 | 0,040 | 0,009 | 1,536 | 1,218 | 0,035 | -0,124 | 1,961 | 2,128 |
| 2030 | 0,020 | 0,058 | 0,734 | 1,052 | 0,012 | 0,004 | 0,551 | 0,594 | 0,005 | -0,052 | 0,294 | 0,967 |
| 2087 | 0,074 | 0,195 | 2,692 | 3,460 | 0,026 | -0,010 | 1,168 | -1,506 | -0,020 | -0,300 | -1,320 | 5,879 |
| 2121 | 0,027 | 0,026 | 1,008 | 0,474 | 0,004 | -0,016 | 0,172 | -2,317 | -0,019 | -0,054 | -1,182 | 0,990 |
| 2124 | 0,012 | 0,016 | 0,430 | 0,289 | 0,105 | 0,070 | 3,540 | 8,371 | 0,176 | 0,110 | 8,328 | -1,654 |
| 2126 | 0,025 | 0,065 | 0,896 | 1,114 | 0,011 | 0,007 | 0,422 | 0,934 | -0,013 | -0,054 | -0,738 | 0,986 |
| 2187 | 0,013 | 0,021 | 0,494 | 0,400 | 0,039 | 0,073 | 1,719 | 10,727 | 0,064 | 0,120 | 3,853 | -2,079 |
| 2232 | 0,020 | 0,027 | 0,753 | 0,486 | 0,018 | 0,005 | 0,960 | 0,821 | 0,019 | -0,022 | 1,434 | 0,480 |
| 2404 | 0,020 | 0,055 | 0,756 | 1,024 | 0,005 | -0,017 | 0,278 | -3,186 | -0,006 | -0,084 | -0,468 | 1,925 |
| 2412 | 0,026 | 0,030 | 0,907 | 0,515 | 0,041 | 0,027 | 1,835 | 4,283 | 0,051 | 0,025 | 3,366 | -0,507 |
| 2472 | 0,042 | 0,084 | 1,507 | 1,441 | -0,014 | 0,015 | -0,615 | 2,032 | -0,066 | -0,084 | -4,237 | 1,463 |
| 2509 | 0,017 | 0,002 | 0,593 | 0,043 | 0,034 | 0,039 | 1,265 | 5,018 | 0,043 | 0,065 | 2,336 | -1,083 |
| 2550 | 0,024 | 0,047 | 0,888 | 0,839 | 0,050 | -0,004 | 1,984 | -0,635 | 0,067 | -0,056 | 3,777 | 1,069 |
| 2608 | 0,013 | 0,019 | 0,476 | 0,332 | -0,009 | -0,007 | -0,470 | -1,384 | -0,023 | -0,026 | -1,798 | 0,615 |
| 2629 | 0,050 | 0,100 | 1,812 | 1,754 | 0,028 | 0,004 | 1,175 | 0,513 | -0,004 | -0,125 | -0,238 | 2,282 |
| 2630 | 0,040 | 0,147 | 1,402 | 2,514 | 0,015 | 0,026 | 0,676 | 3,972 | -0,007 | -0,105 | -0,450 | 2,122 |
| 2638 | 0,030 | 0,038 | 1,043 | 0,643 | 0,014 | -0,042 | 0,590 | -6,909 | -0,002 | -0,107 | -0,126 | 2,264 |
| CE704 | 0,021 | 0,039 | 0,807 | 0,720 | 0,017 | -0,032 | 0,838 | -5,390 | 0,014 | -0,111 | 0,929 | 2,206 |
| CE7010 | 0,018 | 0,041 | 0,656 | 0,694 | 0,020 | 0,009 | 0,959 | 1,544 | 0,021 | -0,018 | 1,452 | 0,381 |
| CE7011 | 0,023 | 0,046 | 0,828 | 0,795 | 0,043 | -0,008 | 1,855 | -1,220 | 0,056 | -0,056 | 3,556 | 1,095 |
| CE7032 | 0,024 | 0,031 | 0,923 | 0,577 | 0,023 | 0,033 | 0,964 | 4,803 | 0,019 | 0,021 | 1,093 | -0,375 |
| CE7037 | 0,040 | 0,020 | 1,505 | 0,382 | 0,011 | -0,014 | 0,512 | -2,317 | -0,017 | -0,049 | -1,080 | 0,955 |
| CE60018 | 0,019 | 0,031 | 0,715 | 0,555 | -0,007 | -0,030 | -0,335 | -5,058 | -0,029 | -0,083 | -2,017 | 1,774 |

Tab. 25. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě parametrů fluorescence chlorofylu měřených na temnotně adaptovaných listech (pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum ... γ RC; průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII ... ABS/RC; maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII ... TP_0 /RC) **v souboru 25 inbredních linií kukuřice** pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu **po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody**. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | γ RC | | | | ABS/RC | | | | TP_0 /RC | | | |
|----------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|------------|--------|--------|--------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,001 | 0,042 | 0,239 | 1,221 | -0,030 | -0,937 | 0,271 | 1,287 | 0,031 | -0,304 | -1,530 | 1,542 |
| 2022 | 0,012 | 0,030 | 2,204 | 0,927 | -0,311 | -0,710 | 2,487 | 0,888 | -0,087 | -0,099 | 4,012 | 0,468 |
| 2023 | 0,007 | 0,049 | 1,179 | 1,403 | -0,127 | -1,102 | 1,168 | 1,524 | -0,040 | -0,261 | 2,009 | 1,321 |
| 2030 | 0,017 | 0,053 | 3,019 | 1,594 | -0,362 | -1,339 | 3,041 | 1,720 | -0,126 | -0,365 | 6,022 | 1,787 |
| 2087 | 0,015 | 0,057 | 2,415 | 1,597 | -0,252 | -1,301 | 2,336 | 1,838 | -0,086 | -0,290 | 4,453 | 1,501 |
| 2121 | 0,008 | 0,027 | 1,441 | 0,787 | -0,158 | -0,557 | 1,390 | 0,749 | -0,052 | -0,203 | 2,603 | 1,018 |
| 2124 | -0,020 | 0,013 | -3,950 | 0,419 | 0,468 | -0,308 | -3,450 | 0,351 | 0,169 | -0,102 | -7,807 | 0,474 |
| 2126 | 0,005 | 0,037 | 1,019 | 1,192 | -0,274 | -1,079 | 2,045 | 1,254 | -0,021 | -0,237 | 0,979 | 1,086 |
| 2187 | 0,005 | 0,019 | 0,847 | 0,584 | -0,132 | -0,431 | 1,064 | 0,534 | -0,035 | -0,136 | 1,628 | 0,649 |
| 2232 | 0,010 | 0,024 | 1,678 | 0,719 | -0,195 | -0,518 | 1,702 | 0,685 | -0,076 | -0,182 | 3,748 | 0,899 |
| 2404 | 0,004 | 0,029 | 0,636 | 0,898 | -0,074 | -0,705 | 0,609 | 0,876 | 0,015 | -0,178 | -0,718 | 0,836 |
| 2412 | 0,001 | 0,015 | 0,229 | 0,450 | -0,023 | -0,291 | 0,205 | 0,380 | 0,006 | -0,053 | -0,324 | 0,263 |
| 2472 | 0,007 | 0,038 | 1,259 | 1,193 | -0,148 | -1,135 | 1,188 | 1,400 | 0,050 | -0,118 | -2,293 | 0,557 |
| 2509 | -0,003 | 0,003 | -0,533 | 0,103 | 0,070 | -0,053 | -0,505 | 0,057 | 0,017 | 0,007 | -0,759 | -0,031 |
| 2550 | -0,010 | 0,029 | -1,844 | 0,869 | 0,246 | -0,639 | -1,899 | 0,849 | 0,125 | -0,180 | -5,705 | 0,892 |
| 2608 | 0,026 | 0,025 | 4,390 | 0,744 | -0,570 | -0,538 | 5,078 | 0,726 | -0,261 | -0,205 | 13,012 | 1,028 |
| 2629 | 0,009 | 0,031 | 1,671 | 0,989 | -0,242 | -0,816 | 1,921 | 0,978 | -0,029 | -0,033 | 1,353 | 0,155 |
| 2630 | 0,017 | 0,061 | 2,564 | 1,558 | -0,270 | -1,116 | 2,779 | 1,793 | -0,122 | -0,437 | 6,857 | 2,525 |
| 2638 | 0,015 | 0,052 | 2,645 | 1,474 | -0,339 | -1,219 | 2,808 | 1,690 | -0,124 | -0,432 | 5,949 | 2,198 |
| CE704 | -0,001 | 0,035 | -0,216 | 1,069 | 0,028 | -0,873 | -0,225 | 1,099 | 0,057 | -0,235 | -2,667 | 1,125 |
| CE7010 | -0,009 | 0,020 | -1,582 | 0,578 | 0,176 | -0,412 | -1,438 | 0,548 | 0,161 | -0,121 | -7,475 | 0,597 |
| CE7011 | 0,006 | 0,059 | 1,066 | 1,672 | -0,115 | -1,321 | 1,035 | 1,860 | -0,010 | -0,417 | 0,503 | 2,166 |
| CE7032 | -0,005 | 0,013 | -0,844 | 0,405 | 0,113 | -0,303 | -0,883 | 0,372 | 0,066 | -0,003 | -3,124 | 0,016 |
| CE7037 | 0,008 | 0,038 | 1,443 | 1,132 | -0,161 | -0,880 | 1,349 | 1,141 | -0,049 | -0,213 | 2,323 | 1,038 |
| CE60018 | 0,015 | 0,037 | 2,519 | 1,037 | -0,306 | -0,725 | 2,834 | 1,034 | -0,099 | -0,304 | 5,085 | 1,581 |

Tab. 26. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě parametrů fluorescence chlorofylu měřených na temnotně adaptovaných listech (tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII ... ET_0/RC ; tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII ... RE_0/RC ; tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII ... DI_0/RC) **v souboru 25 inbredních linií kukuřice** pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu **po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody**. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | ET_0/RC | | | | RE_0/RC | | | | DI_0/RC | | | |
|----------------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|-----------|--------|--------|--------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,085 | 0,021 | 1,414 | 0,519 | 0,029 | -0,174 | 0,575 | 4,572 | -0,061 | -0,633 | 0,746 | 1,281 |
| 2022 | 0,010 | 0,188 | 0,164 | 4,591 | 0,058 | 0,122 | 0,988 | -3,228 | -0,225 | -0,611 | 2,132 | 1,045 |
| 2023 | 0,074 | 0,162 | 1,241 | 4,026 | 0,086 | -0,055 | 1,502 | 1,346 | -0,088 | -0,841 | 1,115 | 1,775 |
| 2030 | -0,015 | -0,029 | -0,256 | -0,717 | -0,004 | -0,091 | -0,070 | 2,430 | -0,236 | -0,974 | 2,489 | 1,664 |
| 2087 | 0,136 | 0,367 | 2,397 | 9,403 | 0,039 | -0,102 | 0,828 | 2,937 | -0,166 | -1,011 | 2,075 | 2,173 |
| 2121 | 0,041 | -0,042 | 0,710 | -1,061 | -0,005 | -0,107 | -0,105 | 2,832 | -0,106 | -0,354 | 1,201 | 0,676 |
| 2124 | 0,127 | -0,012 | 1,998 | -0,278 | 0,338 | 0,163 | 4,636 | -3,217 | 0,298 | -0,206 | -2,143 | 0,262 |
| 2126 | 0,066 | 0,065 | 1,024 | 1,437 | 0,017 | -0,036 | 0,255 | 0,803 | -0,253 | -0,842 | 1,877 | 1,179 |
| 2187 | 0,013 | -0,018 | 0,216 | -0,438 | 0,090 | 0,163 | 1,633 | -4,006 | -0,097 | -0,294 | 0,931 | 0,477 |
| 2232 | 0,015 | -0,023 | 0,264 | -0,559 | 0,033 | -0,029 | 0,770 | 0,907 | -0,119 | -0,336 | 1,349 | 0,626 |
| 2404 | 0,061 | 0,065 | 1,024 | 1,590 | 0,015 | -0,090 | 0,353 | 2,899 | -0,089 | -0,528 | 0,920 | 0,889 |
| 2412 | 0,068 | 0,046 | 1,127 | 1,107 | 0,104 | 0,055 | 2,101 | -1,489 | -0,029 | -0,238 | 0,341 | 0,420 |
| 2472 | 0,146 | 0,161 | 2,217 | 3,654 | -0,025 | 0,004 | -0,454 | -0,087 | -0,198 | -1,017 | 1,993 | 1,654 |
| 2509 | 0,056 | 0,011 | 0,828 | 0,230 | 0,102 | 0,114 | 1,498 | -2,279 | 0,053 | -0,060 | -0,382 | 0,071 |
| 2550 | 0,135 | 0,030 | 2,119 | 0,723 | 0,178 | -0,060 | 2,857 | 1,619 | 0,122 | -0,459 | -1,043 | 0,872 |
| 2608 | -0,113 | -0,063 | -1,914 | -1,554 | -0,092 | -0,063 | -2,256 | 2,088 | -0,309 | -0,333 | 3,666 | 0,649 |
| 2629 | 0,125 | 0,249 | 2,004 | 5,716 | 0,067 | 0,004 | 1,172 | -0,086 | -0,213 | -0,783 | 1,902 | 1,165 |
| 2630 | 0,025 | 0,132 | 0,454 | 3,632 | 0,001 | -0,057 | 0,027 | 1,793 | -0,148 | -0,678 | 2,251 | 1,782 |
| 2638 | 0,009 | -0,142 | 0,144 | -3,468 | -0,005 | -0,244 | -0,088 | 7,135 | -0,215 | -0,787 | 2,129 | 1,644 |
| CE704 | 0,087 | -0,008 | 1,441 | -0,209 | 0,061 | -0,153 | 1,213 | 4,303 | -0,029 | -0,637 | 0,291 | 1,082 |
| CE7010 | 0,141 | 0,041 | 2,180 | 0,972 | 0,095 | -0,008 | 1,833 | 0,238 | 0,015 | -0,291 | -0,156 | 0,561 |
| CE7011 | 0,053 | -0,109 | 0,882 | -2,761 | 0,104 | -0,135 | 2,030 | 3,814 | -0,105 | -0,904 | 1,254 | 1,887 |
| CE7032 | 0,099 | 0,076 | 1,680 | 1,873 | 0,082 | 0,083 | 1,450 | -2,018 | 0,047 | -0,300 | -0,387 | 0,468 |
| CE7037 | 0,081 | -0,057 | 1,358 | -1,488 | 0,015 | -0,092 | 0,308 | 2,686 | -0,112 | -0,667 | 1,196 | 1,199 |
| CE60018 | -0,006 | -0,085 | -0,105 | -2,196 | -0,048 | -0,157 | -1,092 | 4,923 | -0,207 | -0,421 | 2,654 | 0,925 |

Tab. 27. Indexy citlivosti/odolnosti k suchu (TOL, SSI) vypočítané na základě parametrů fluorescence chlorofylu měřených na temnotně adaptovaných listech (performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci $Q_B \dots PI_{ABS}$; performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI $\dots PI_{TOTAL}$) **v souboru 25 inbredních linií kukuřice** pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu **po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody**. Pět linií vykazujících nejmenší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno zeleně, pět linií vykazujících největší citlivost k suchu je vyznačeno silně a podbarveno růžově.

| Inbrední linie | PI_{ABS} | | | | PI_{TOTAL} | | | |
|----------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | TOL | | SSI | | TOL | | SSI | |
| | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů | 6 dnů | 10 dnů |
| 2017 | 0,284 | 0,856 | 0,853 | 1,106 | 0,242 | 1,515 | 0,616 | 2,040 |
| 2022 | 0,254 | 0,650 | 1,153 | 1,084 | 0,526 | 0,662 | 1,507 | 1,255 |
| 2023 | 0,428 | 1,082 | 1,219 | 1,359 | 0,718 | 0,951 | 1,317 | 1,082 |
| 2030 | 0,389 | 0,744 | 1,510 | 1,294 | 0,423 | 0,691 | 1,269 | 1,253 |
| 2087 | 0,674 | 1,274 | 2,023 | 1,577 | 0,575 | 0,887 | 1,468 | 1,286 |
| 2121 | 0,314 | 0,533 | 1,121 | 0,804 | 0,249 | 0,398 | 0,714 | 0,591 |
| 2124 | -0,220 | 0,202 | -1,247 | 0,457 | 0,570 | 0,736 | 1,386 | 1,060 |
| 2126 | 0,114 | 0,638 | 0,481 | 1,069 | 0,135 | 0,527 | 0,367 | 0,955 |
| 2187 | 0,134 | 0,301 | 0,597 | 0,587 | 0,354 | 0,664 | 1,190 | 1,205 |
| 2232 | 0,266 | 0,476 | 0,952 | 0,700 | 0,226 | 0,323 | 0,895 | 0,718 |
| 2404 | 0,205 | 0,548 | 0,873 | 1,014 | 0,146 | 0,279 | 0,666 | 0,770 |
| 2412 | 0,251 | 0,502 | 0,734 | 0,697 | 0,429 | 0,507 | 1,150 | 0,877 |
| 2472 | 0,431 | 0,623 | 1,575 | 1,008 | 0,197 | 0,643 | 0,607 | 0,970 |
| 2509 | 0,026 | 0,109 | 0,141 | 0,242 | 0,202 | 0,360 | 0,658 | 0,680 |
| 2550 | 0,033 | 0,646 | 0,146 | 0,927 | 0,284 | 0,490 | 0,843 | 0,798 |
| 2608 | 0,463 | 0,537 | 1,496 | 0,725 | 0,265 | 0,265 | 1,017 | 0,594 |
| 2629 | 0,247 | 0,645 | 1,080 | 1,164 | 0,346 | 0,443 | 1,102 | 0,837 |
| 2630 | 0,686 | 1,593 | 1,579 | 1,469 | 0,560 | 1,163 | 1,215 | 1,332 |
| 2638 | 0,433 | 0,978 | 1,488 | 1,170 | 0,451 | 0,533 | 1,188 | 0,872 |
| CE704 | 0,132 | 0,492 | 0,576 | 0,905 | 0,156 | 0,241 | 0,597 | 0,531 |
| CE7010 | 0,079 | 0,561 | 0,286 | 0,729 | 0,161 | 0,421 | 0,539 | 0,750 |
| CE7011 | 0,356 | 1,071 | 1,094 | 1,350 | 0,555 | 0,847 | 1,409 | 1,276 |
| CE7032 | 0,073 | 0,270 | 0,388 | 0,523 | 0,164 | 0,442 | 0,574 | 0,794 |
| CE7037 | 0,328 | 0,556 | 1,300 | 1,012 | 0,285 | 0,427 | 0,941 | 0,920 |
| CE60018 | 0,444 | 0,796 | 1,343 | 0,965 | 0,341 | 0,413 | 0,967 | 0,675 |

Bylo zřejmé, že pořadí genotypů na základě TOL a SSI indexů vypočítaných z různých charakteristik se příliš nepřekrývá, což potvrdila i další korelační analýza, kde jako výchozí data byly použity právě tyto TOL a SSI indexy vypočítané z jednotlivých charakteristik (**Příloha 1, Tab. 28-29**). Jedinou charakteristikou, u níž byla statisticky průkazná korelace příslušných TOL i SSI indexů s TOL i SSI indexy stanovenými na základě hmotnosti suché biomasy, byla P_N (v případě SSI indexu jak u šestidenního, tak u desetidenního sucha, v případě TOL indexu u desetidenního sucha) (**Příloha 1, Tab. 28-29**). U SSI indexů jsem našla pozitivní korelaci také pro indexy vypočítané z hodnot E (ovšem pouze u desetidenního sucha) a slabou pozitivní korelaci i pro indexy vypočítané z hodnot WUE_i (ale nikoli z WUE), a to jak u šestidenní, tak u desetidenní periody bez zalévání (**Tab. 29**). Ostatní statisticky průkazné korelace mezi různými TOL a SSI indexy se týkaly spíše vzájemných vztahů mezi parametry počítanými alespoň částečně ze stejných výchozích hodnot (**Příloha 1, Tab. 28-29**). Na základě výše uvedených výsledků jsem tedy usoudila, že jak PRI a NDVI indexy, tak parametry JIP testu, g_s či WUE nemají u mladých rostlin kukuřice příliš velkou výpovědní hodnotu o citlivosti/odolnosti rostlin k vodnímu deficitu. Naproti tomu citlivost/odolnost stanovená na základě měření P_N dobře koreluje s citlivostí/odolností k suchu stanovenou na základě produkce biomasy, a to jak v podmínkách mírného stresu suchem, tak v podmínkách delšího/silnějšího sucha.

Tab. 28. Schematické znázornění korelací mezi TOL indexy citlivosti/odolnosti k suchu vypočítanými z vybraných morfologických a fyziologických charakteristik analyzovaných v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6 dnů (v levé dolní části tabulky), resp. 10 dnů (v pravé horní části tabulky) od začátku stresové periody. Vysvětlení barevné symboliky je uvedeno na konci tabulky. DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin, DMT ... hmotnost sušiny celých rostlin, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, E ... rychlost transpirace, g_s ... vodivost průduchů, WUE ... „okamžitá“ efektivita využití vody, WUE_i ... „vnitřní“ efektivita využití vody, PRI ... fotochemický reflektanční index, NDVI ... normalizovaný diferenční vegetační index, Q_Y ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u světlně adaptovaných listů; charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaných listů: ϕ_{P0} ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, ϕ_{E0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B , ϕ_{RE0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, ϕ_{D0} ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie, ψ_{E0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B , ψ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, δ_{RE0} ... účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, γ_{RC} ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, ABS/RC ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, TP_0/RC ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, ET_0/RC ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, RE_0/RC ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, DI_0/RC ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, PI_{ABS} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q_B , PI_{TOTAL} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI.

| Charakteristika | DMS | DMR | DMT | P_N | g_s | E | WUE | WUE_i | PRI | NDVI | Q_Y | ϕ_{P0} | ϕ_{E0} | ϕ_{RE0} | ϕ_{D0} | ψ_{E0} | ψ_{RE0} | δ_{RE0} | γ_{RC} | ABS/RC | TP_0/RC | ET_0/RC | RE_0/RC | DI_0/RC | PI_{ABS} | PI_{TOTAL} |
|-----------------|-----|-----|-----|-------|-------|-----|-----|---------|-----|------|-------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|----------------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|--------------|
| DMS | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DMR | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DMT | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P_N | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| g_s | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WUE | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WUE_i | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PRI | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NDVI | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q_Y | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{P0} | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{E0} | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{D0} | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | | |
| ψ_{E0} | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | | |
| ψ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | | |
| δ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | | |
| γ_{RC} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | | |
| ABS/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | | |
| TP_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | | |
| ET_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | | |
| RE_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | | |
| DI_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | | |
| PI_{ABS} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x | |
| PI_{TOTAL} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | x |

Statistická průkaznost Pearsonova korelačního koeficientu:

| Pozitivní korelace | | | Negativní korelace | | |
|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------|
| $p < 0,001$ | $p = (0,001; 0,01)$ | $p = (0,01; 0,05)$ | $p = (0,01; 0,05)$ | $p = (0,001; 0,01)$ | $p < 0,001$ |

Tab. 29. Schematické znázornění korelací mezi SSI indexy citlivosti/odolnosti k suchu vypočítanými z vybraných morfologických a fyziologických charakteristik analyzovaných v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6 dnů (v levé dolní části tabulky), resp. 10 dnů (v pravé horní části tabulky) od začátku stresové periody. Vysvětlení barevné symboliky je uvedeno na konci tabulky. DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin, DMT ... hmotnost sušiny celých rostlin, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, E ... rychlost transpirace, g_s ... vodivost průduchů, WUE ... „okamžitá“ efektivita využití vody, WUE_i ... „vnitřní“ efektivita využití vody, PRI ... fotochemický reflektanční index, NDVI ... normalizovaný diferenční vegetační index, Q_Y ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u světlně adaptovaných listů; charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaných listů: ϕ_{P0} ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, ϕ_{E0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B , ϕ_{RE0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, ϕ_{D0} ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie, ψ_{E0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B , ψ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, δ_{RE0} ... účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, γ_{RC} ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, ABS/RC ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, TP_0/RC ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, ET_0/RC ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, RE_0/RC ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, DI_0/RC ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, PI_{ABS} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q_B , PI_{TOTAL} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI.

| Charakteristika | DMS | DMR | DMT | P_N | g_s | E | WUE | WUE_i | PRI | NDVI | Q_Y | ϕ_{P0} | ϕ_{E0} | ϕ_{RE0} | ϕ_{D0} | ψ_{E0} | ψ_{RE0} | δ_{RE0} | γ_{RC} | ABS/RC | TP_0/RC | ET_0/RC | RE_0/RC | DI_0/RC | PI_{ABS} | PI_{TOTAL} |
|-----------------|-----|-----|-----|-------|-------|-----|-----|---------|-----|------|-------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|----------------|---------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|--------------|
| DMS | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DMR | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| DMT | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| P_N | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| g_s | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WUE | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| WUE_i | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PRI | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NDVI | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Q_Y | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{P0} | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{E0} | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | | |
| ϕ_{D0} | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | | |
| ψ_{E0} | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | | |
| ψ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | | |
| δ_{RE0} | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | | |
| γ_{RC} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | | |
| ABS/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | | |
| TP_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | | |
| ET_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | | |
| RE_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | | |
| DI_0/RC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | | |
| PI_{ABS} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × | |
| PI_{TOTAL} | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | × |

Statistická průkaznost Pearsonova korelačního koeficientu:

| Pozitivní korelace | | | Negativní korelace | | |
|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------|
| $p < 0,001$ | $p = (0,001; 0,01)$ | $p = (0,01; 0,05)$ | $p = (0,01; 0,05)$ | $p = (0,001; 0,01)$ | $p < 0,001$ |

4.4. Experimentální celek 4

Hlavní náplní tohoto experimentálního celku byla detailní analýza rozdílů mezi dvěma kontrastními inbredními liniemi kukuřice (2023 a CE704), lišícími se citlivostí/odolností k suchu a vybranými v rámci předchozího experimentálního celku. Tento rozbor se týkal morfologických, fyziologických a biochemických charakteristik, byl zaměřen především na fotosyntézu a jeho součásti byla i analýza listového proteomu pomocí dvou různých metod – 2-DGE a iTRAQ. Rostliny byly vystaveny mírnému stresu suchem simulovanému přerušením závlivky po dobu 6 dnů; po této době klesl volumetrický obsah vody v půdě u obou genotypů z původních cca 30 % na cca 12,5 %.

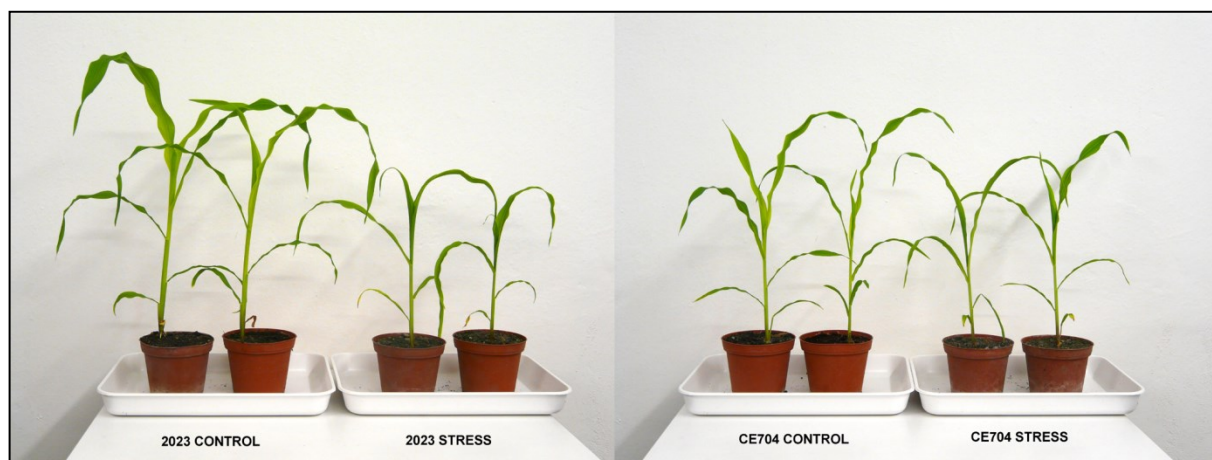
Rostliny inbrední linie CE704 měly v kontrolních podmínkách průkazně vyšší hodnoty LDN a LVN a o něco nižší DMS ve srovnání s linií 2023 (**Obr. 8, 9**). Vykazovaly také průkazně nižší g_s a E (a neprůkazně nižší P_N) a vyšší WUE_i než druhý hodnocený genotyp (**Obr. 10**). Rovněž aktivity PSII, PSI a WETC měřené v odpáření od fotofosforylace (nikoli však při sprážení s fotofosforylací) v chloroplastech izolovaných z jejich listů u nich byly nižší, a to bez ohledu na způsob vyjádření těchto charakteristik (**Obr. 13-15**). V ostatních hodnocených charakteristikách se v kontrolních podmínkách mezi sebou oba genotypy nelišily (**Obr. 9-17**).

Stresované rostliny se ve srovnání s kontrolními vyznačovaly zpomalením vývoje, což bylo patrné na jejich celkovém vzhledu a parametrech LDN, LVN, LDH, TLA a DMS. Pokles hodnot těchto parametrů byl výraznější u genotypu 2023 než u CE704 (**Obr. 8, 9**). Hodnoty LWH, DMR a SLW zůstaly vesměs na úrovni kontrolních rostlin (**Obr. 9**).

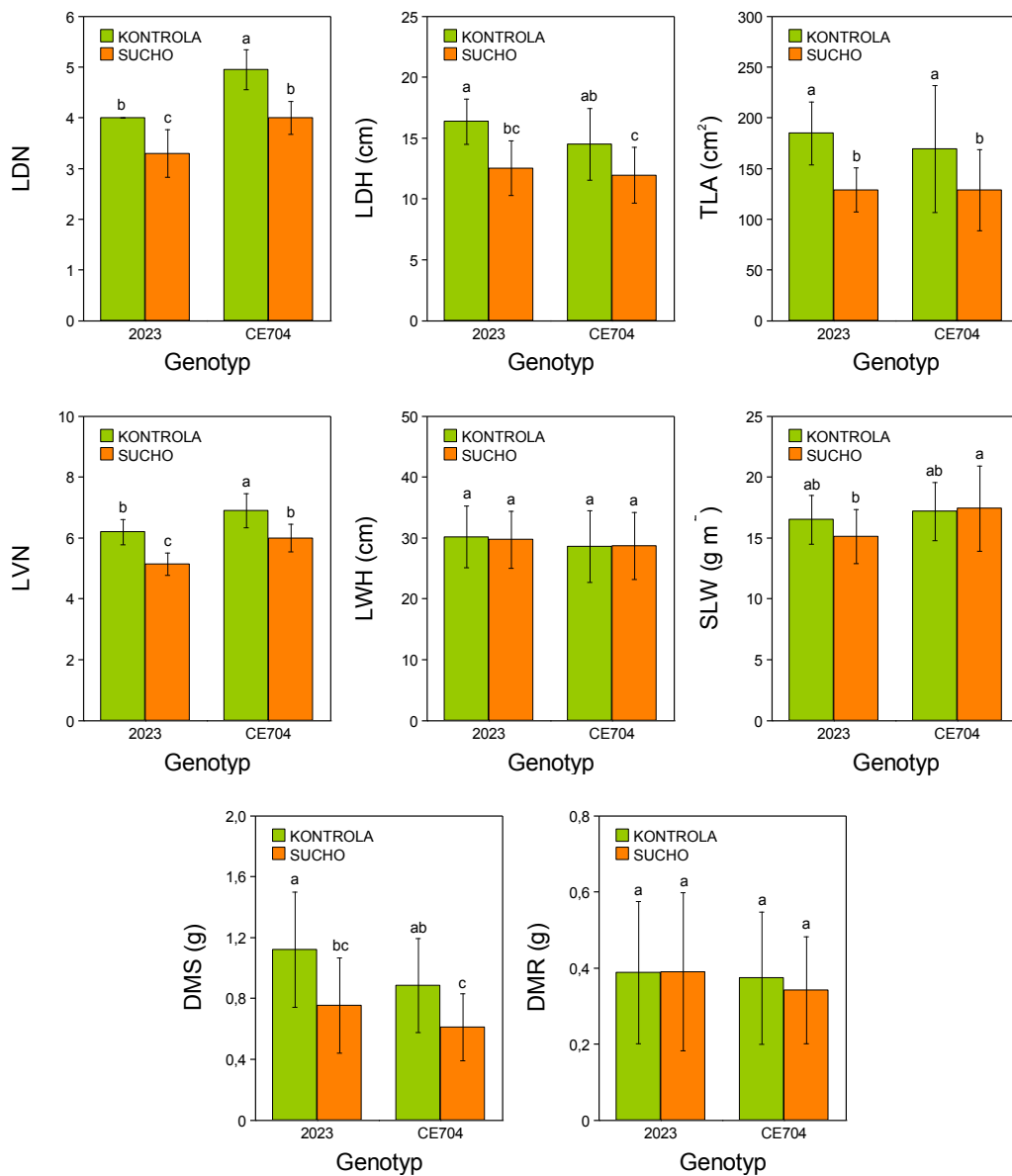
Stres suchem způsobil také statisticky významný pokles RWC u obou hodnocených genotypů, přičemž tento pokles byl u linie CE704 o trochu výraznější než u linie 2023 (**Obr. 10**). Výrazně odlišná reakce obou genotypů na šestidenní stres suchem byla patrná u charakteristik P_N a g_s , jejichž hodnoty se u CE704 v důsledku sucha zvýšily a u 2023 naopak klesly (g_s) nebo zůstaly na úrovni kontrolních rostlin (P_N). E se ve stresových podmínkách u CE704 neměnila, avšak výrazně se snížila u linie 2023. Uvedené změny se odrazily i ve změnách WUE (statisticky významné zvýšení u stresovaných rostlin obou genotypů) a WUE_i (pokles u CE704 a naopak nárůst u 2023) (**Obr. 10**).

Hodnoty PRI a NDVI se u stresovaných rostlin významně nelišily od hodnot těchto indexů naměřených v listech kontrolních rostlin (**Obr. 11**). Pokud byl obsah fotosyntetických pigmentů stanoven spektrofotometricky po jejich extrakci z listů, došlo k jeho snížení u stresovaných rostlin obou genotypů; týkalo se to však jenom Chl *a*, zatímco v případě Chl *b* byl tento pokles statisticky významný jen u linie 2023 a jen při vyjádření na jednotku plochy listu. U Kar a poměrů Chl *a/b* a celkového Chl/Kar nebyly rozdíly mezi kontrolními rostlinami a rostlinami vystavenými šestidenní periodě sucha statisticky průkazné ani u jednoho genotypu (**Obr. 12**).

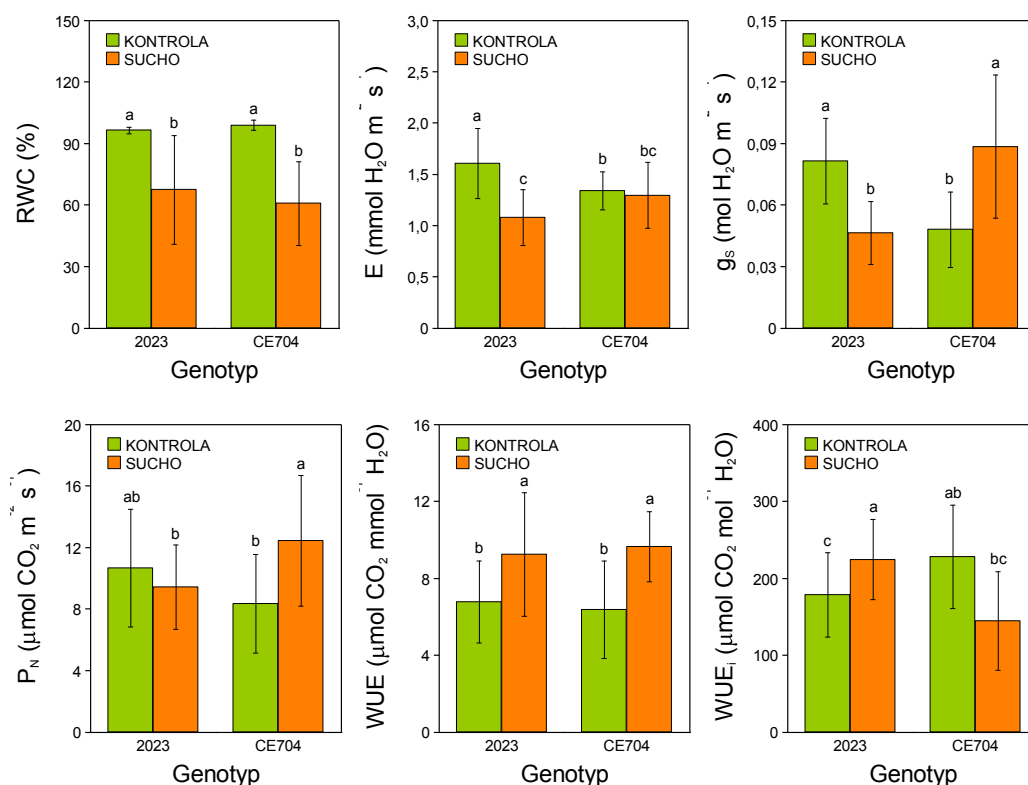
Obr. 8. Vzhled pokusných rostlin dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody („Control“) nebo vystavených vodnímu deficitu („Stress“) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody.



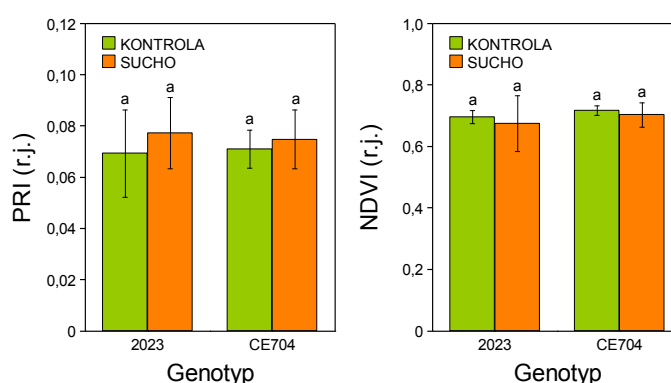
Obr. 9. Vybrané morfologické charakteristiky rostlin (LDN ... počet plně vyvinutých listů, LVN ... počet všech viditelných listů, LDH ... výška rostliny stanovená k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu, LWH ... výška rostliny stanovená ke špičce listu viditelného ve vrcholové růžici, TLA ... celková plocha všech alespoň částečně fotosyntetizujících listů (zahrnutý jen plně vyvinuté listy), SLW ... specifická hmotnost 4. listu, DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



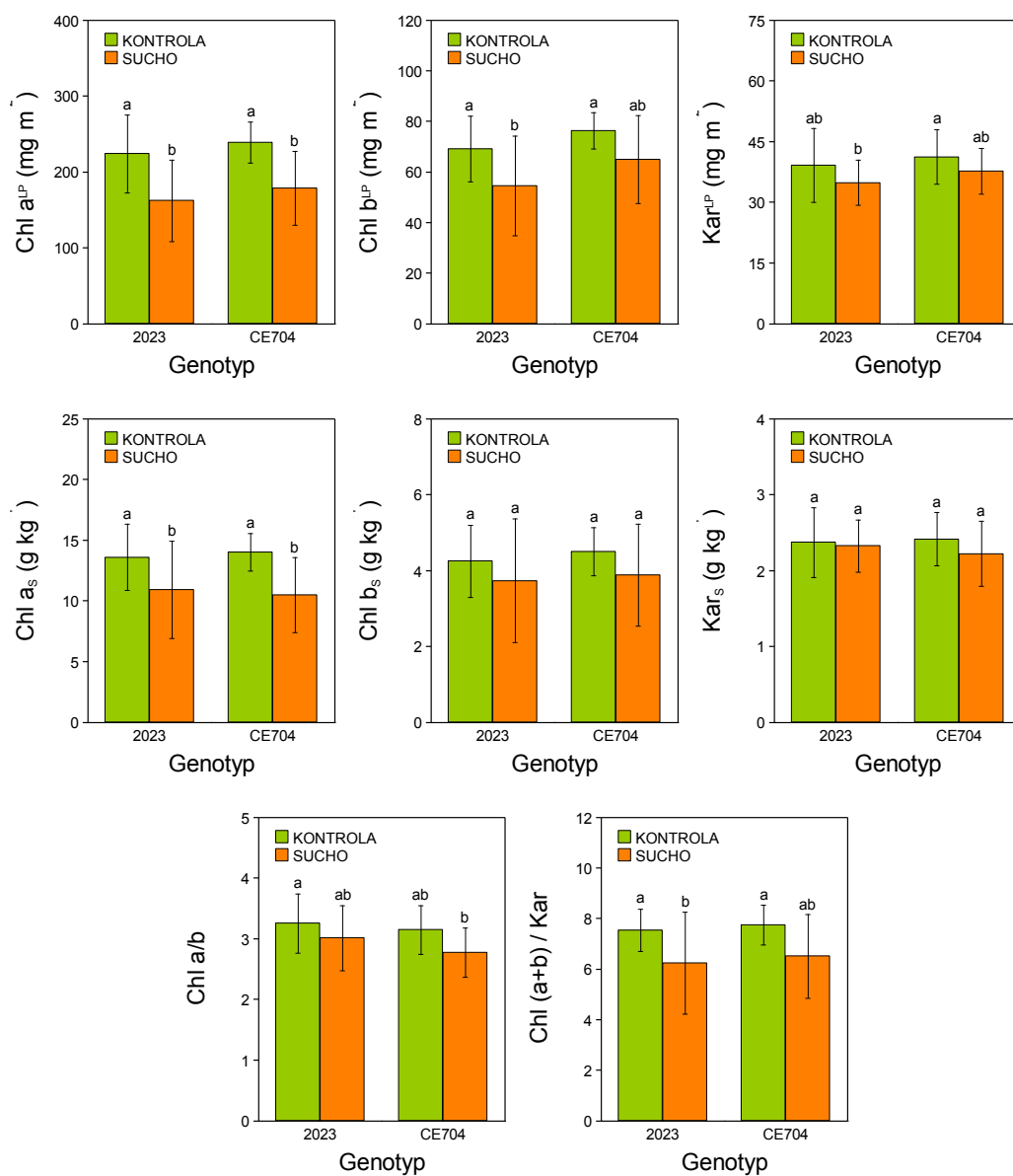
Obr. 10. Vybrané charakteristiky vodního režimu rostlin a výměny plynů (RWC ... relativní obsah vody, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, E ... rychlost transpirace, g_s ... vodivost průduchů, WUE_i ... „okamžitá“ efektivita využití vody, WUE_i ... „vnitřní“ efektivita využití vody) **u dvou inbredních linií kukuřice** (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) **po dobu 6 dnů od začátku stresové periody**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



Obr. 11. Fotochemický reflektanční index (PRI) a normalizovaný diferenční vegetační index (NDVI) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) **po dobu 6 dnů od začátku stresové periody**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. r.j. ... relativní jednotky.

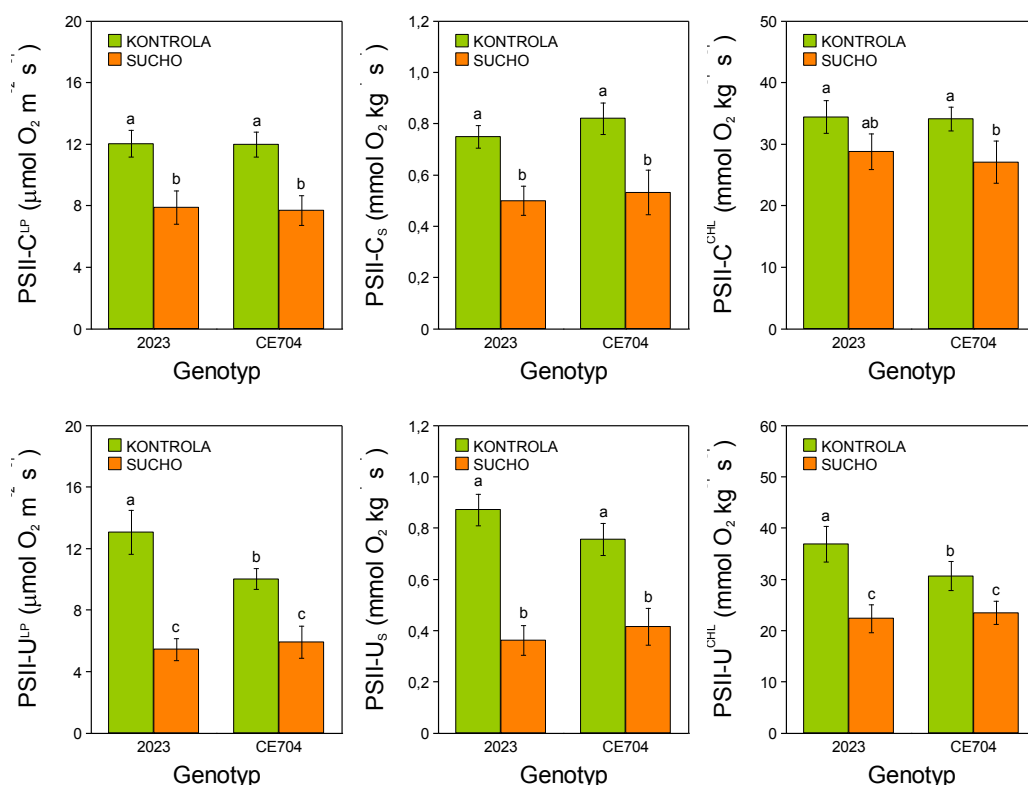


Obr. 12. Obsahy a poměry fotosyntetických pigmentů vyjádřené v přepočtech na jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) (Chl ... chlorofyl, Kar ... celkové karotenoidy) **u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody.** Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.

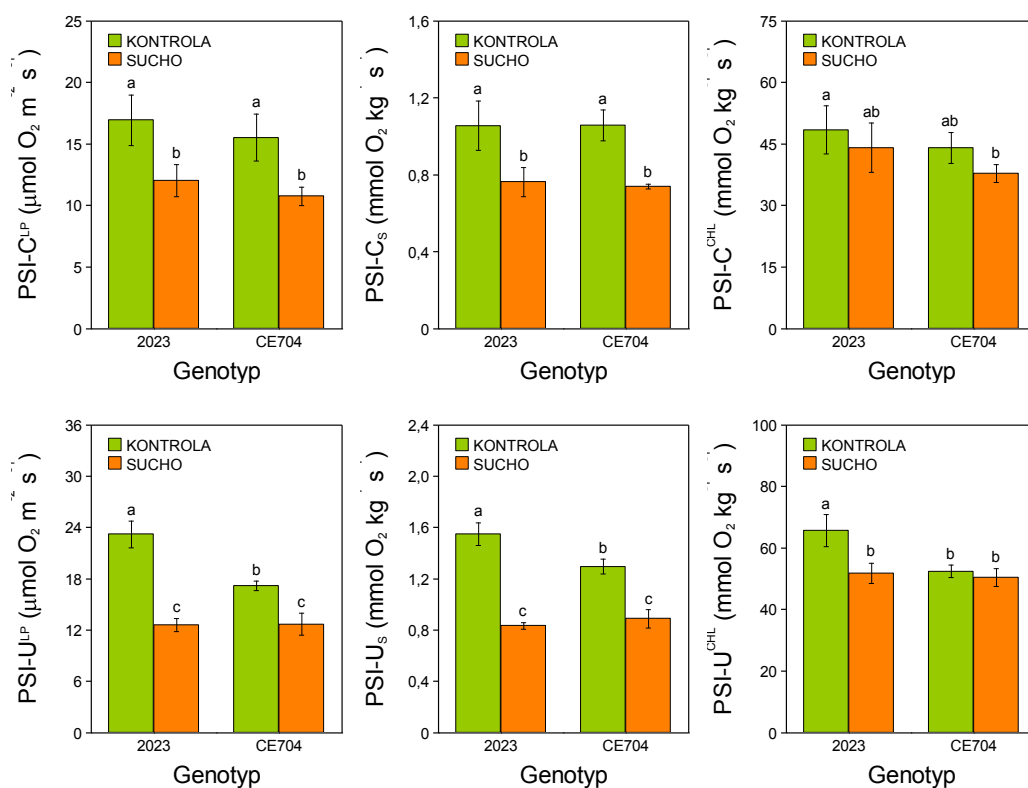


Aktivita PSII měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů se u obou hodnocených genotypů vlivem stresu suchem statisticky významně snížila, přičemž tento pokles byl výraznější při měření v odpřažení od fotofosforylace než při měření ve sprážením s fotofosforylací, a také při vyjádření této charakteristiky v přepočtech na jednotku listové plochy nebo jednotku hmotnosti sušiny listu. Při měření v odpřažení od fotofosforylace se hodnoty tohoto parametru výrazněji snížily u linie 2023 než u CE704, což souviselo spíše s rozdíly mezi oběma genotypy pozorovanými v kontrolních podmínkách (**Obr. 13**). Podobně tomu bylo i při měření aktivity PSI; v tomto případě nebyly při vyjádření tohoto parametru na jednotkové množství chlorofylu rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami statisticky průkazné (s výjimkou linie 2023 při měření v odpřažení od fotofosforylace) (**Obr. 14**). Změny aktivity WETC v reakci na suchu měly podobný trend jako v případě aktivit obou fotosystémů měřených samostatně, statisticky průkazné rozdíly jsem však pozorovala pouze u aktivity WETC měřené v odpřažení od fotofosforylace (**Obr. 15**).

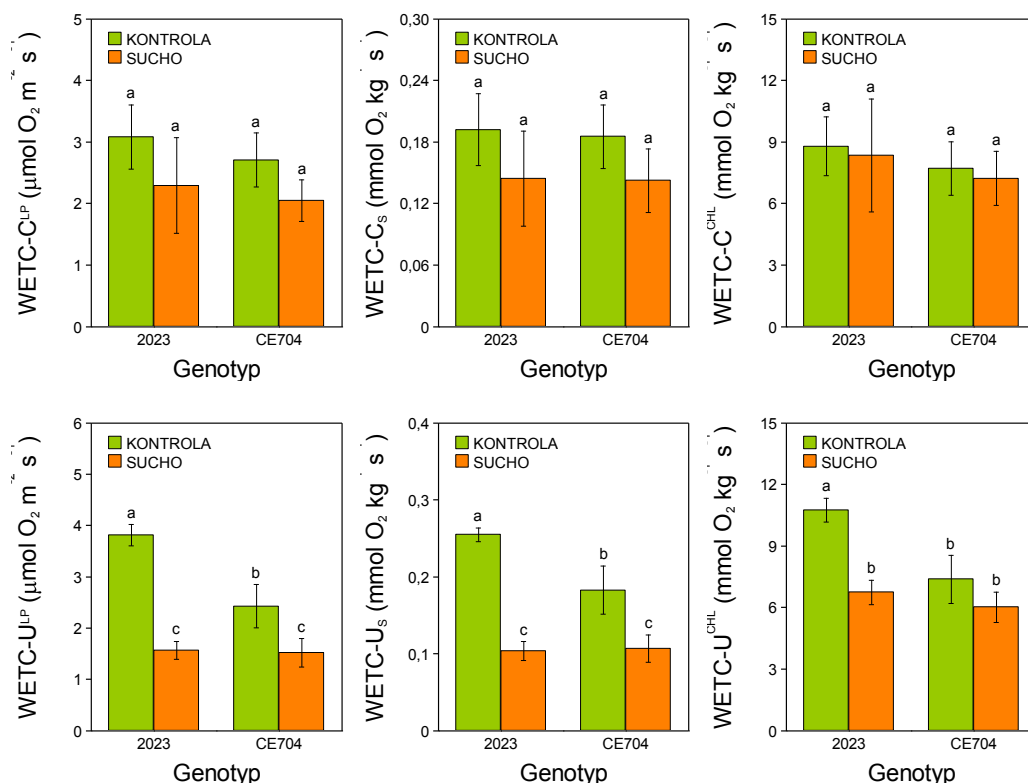
Obr. 13. Aktivita fotosystému II měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů ve sprážení (PSII_C) nebo odpřažení (PSII_U) od fotofosforylace a vyjádřená v přepočtech na jednotkové množství chlorofylu (CHL), jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 4). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



Obr. 14. Aktivita fotosystému I měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů ve sprážení (PSI_C) nebo odpřažení (PSI_U) od fotofosforylace a vyjádřená v přepočtech na jednotkové množství chlorofylu (CHL), jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 4$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



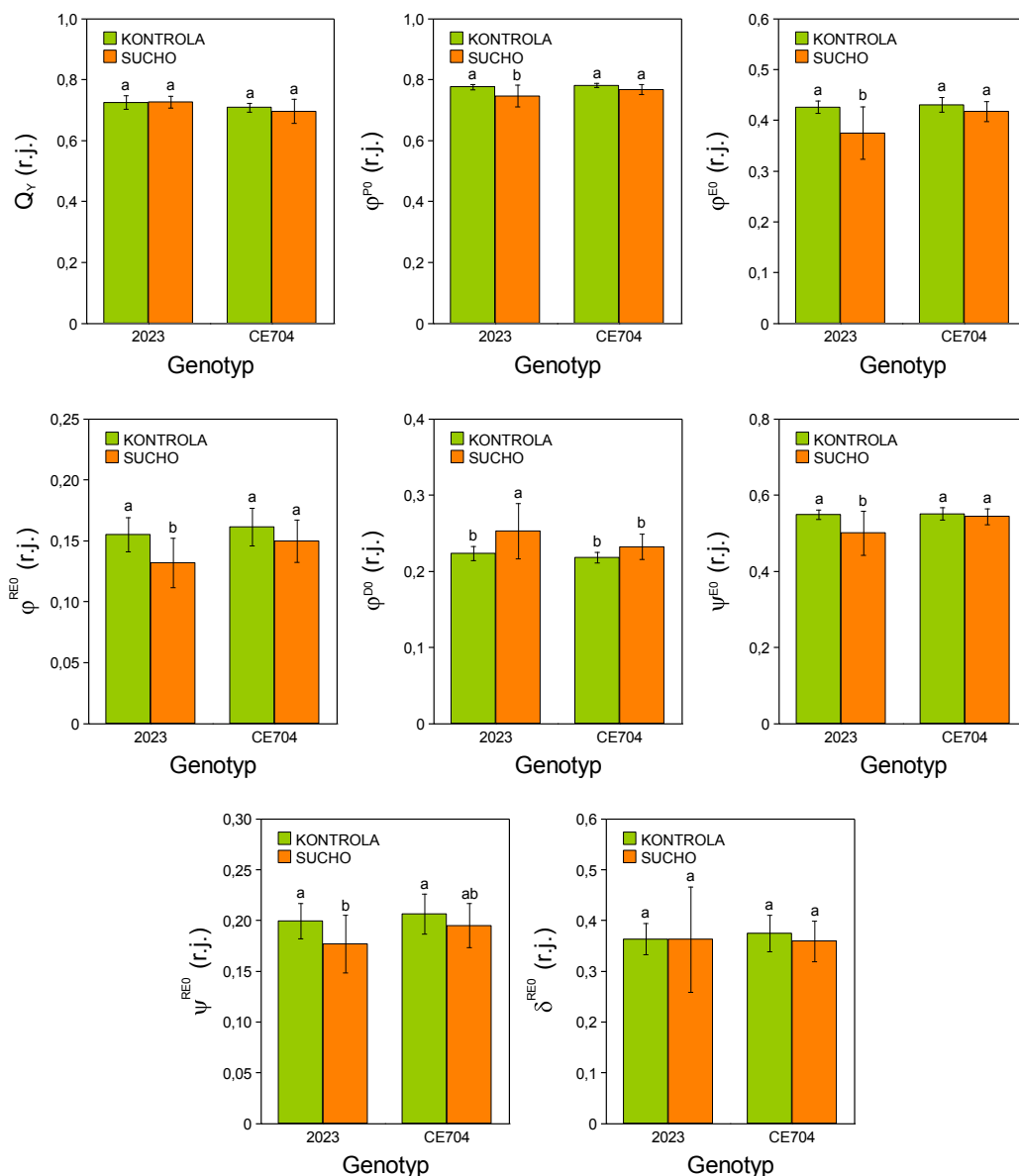
Obr. 15. Aktivita celého fotosyntetického elektron-transportního řetězce měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů ve spřažení ($WETC_C$) nebo odpřažení ($WETC_U$) od fotofosforylace a vyjádřená v přepočtech na jednotkové množství chlorofylu (CHL), jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) u **dvou inbredních linií kukuřice** (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) **po dobu 6 dnů od začátku stresové periody**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 4$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



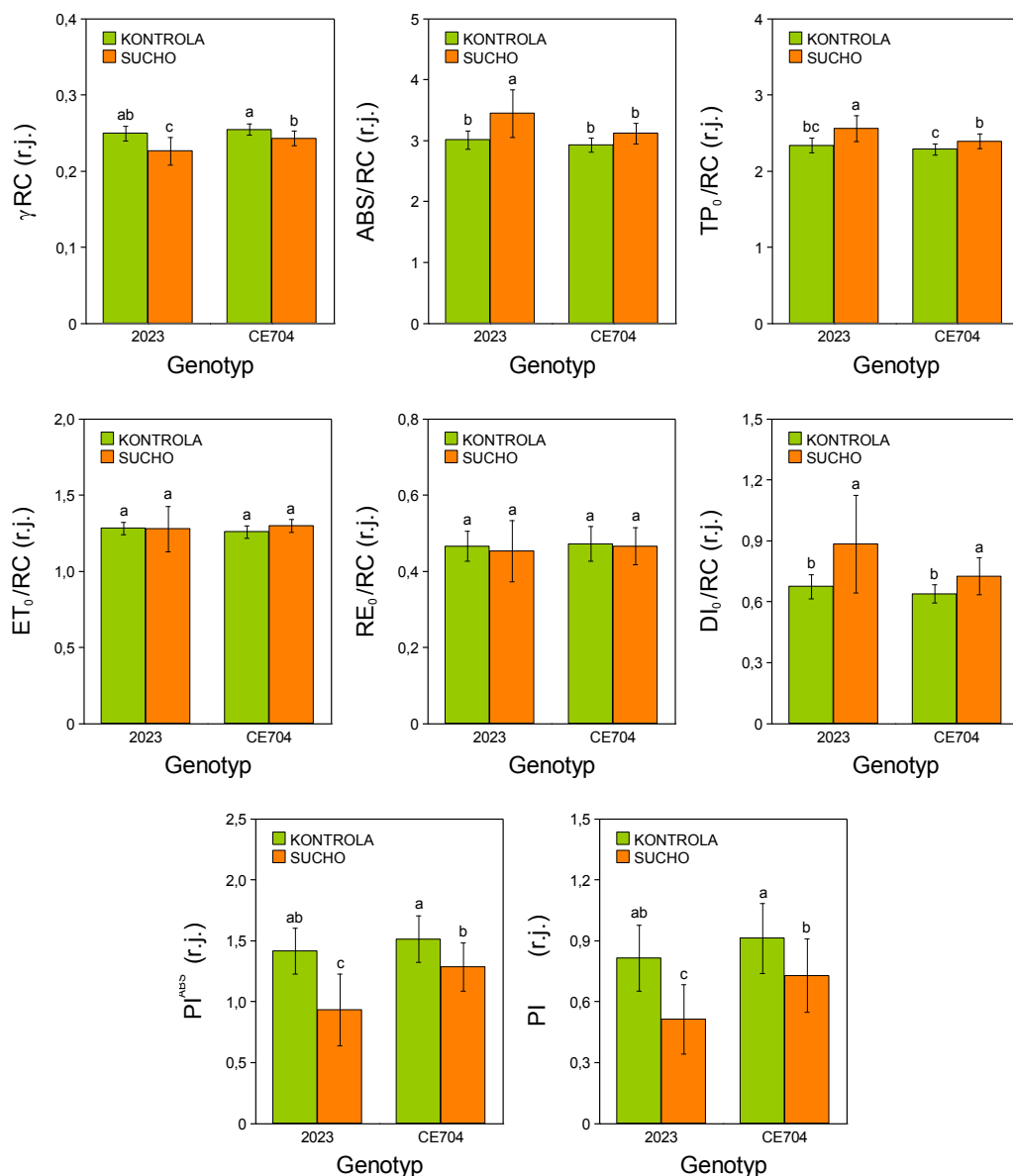
U Q_Y jsem nezaznamenala žádné rozdíly mezi genotypy ani mezi způsobem pěstování (**Obr. 16**). Slabý pokles v důsledku sucha byl pozorovatelný u některých parametrů JIP testu, především Φ_{E0} , Φ_{RE0} , Ψ_{RE0} a γ_{RC} , statisticky průkazný však byl pouze u linie 2023 (**Obr. 16, 17**). Naopak hodnoty parametrů Φ_{D0} , DI_0/RC , ABS/RC a TP_0/RC , spojených s disipací přebytečné světelné energie a obecněji s velikostí světlosběrné antény PSII, zachycením fotonů a předáním jejich energie na PSII RC, se u stresovaných rostlin zvýšily, opět výrazněji u linie 2023 (**Obr. 16, 17**). V důsledku sucha u obou genotypů výrazně poklesly i hodnoty obou performančních indexů (PI_{ABS} i PI_{TOTAL}), větší měrou rovněž u genotypu 2023 (**Obr. 17**).

Podrobnější rozbor OJIP křivek fluorescence chlorofylu, relativní variabilní fluorescence a diferenční kinetiky ukázal několik dalších zajímavých rozdílů mezi reakcí primárních fotosyntetických procesů u obou analyzovaných genotypů. Linie 2023 většinou vykazovala horší reakci na šestidenní periodu bez zalévání než linie CE704. Tzv. K-pás znázorněný pomocí křivky diferenční kinetiky ΔW_{OJ} se u obou genotypů nacházel v „pozitivní“ části grafu, ale u linie 2023 byl mnohem výraznější, což signalizovalo možnost poškození/inaktivace OEC. Pro L-pás zřejmý na grafech časové závislosti diferenční kinetiky ΔW_{OK} , který vypovídá o energetické konektivitě mezi jednotlivými PSII komplexy (možnosti vzájemného předávání si energie), byly hodnoty u stresovaných rostlin také v „pozitivní“ oblasti grafu (reprezentující horší konektivitu ve srovnání s kontrolními rostlinami) a linie CE704 opět reagovala na stres v tomto ohledu méně citlivě než linie 2023. U časové závislosti W_{IP} , která znázorňuje rychlost redukce koncových akceptorů elektronů celého řetězce (tj. za PSI), nebyly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami ani mezi oběma genotypy viditelné výrazné rozdíly, ale v případě velikosti hotovosti (poolu) PSI akceptorů elektronů (část křivky časové závislosti W_{OI} s hodnotami vyššími než 1) byl u stresovaných rostlin zřejmý pokles, výraznější u linie 2023 než u CE704 („nižší“ poloha křivek na grafu) (**Obr. 18**).

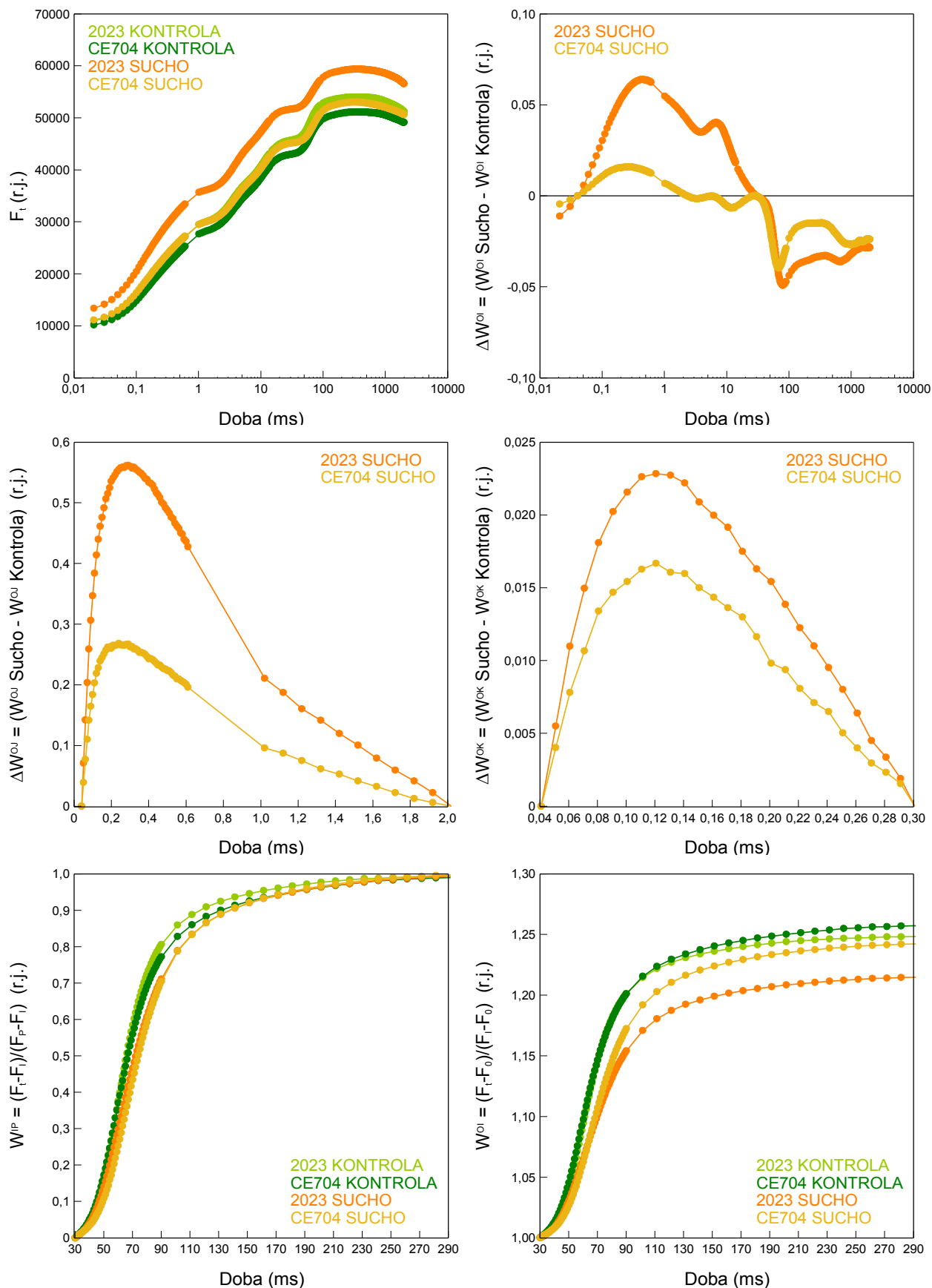
Obr. 16. Maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u listů ve světelně adaptovaném stavu (Q_Y) a další charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu (ϕ_{P0} ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, ϕ_{E0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B , ψ_{E0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B , ϕ_{RE0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, ψ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, δ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, ϕ_{D0} ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. r.j. ... relativní jednotky.



Obr. 17. Vybrané charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu (γ RC ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, ABS/RC ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, TP_0 /RC ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, ET_0 /RC ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, RE_0 /RC ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, DI_0 /RC ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, PI_{ABS} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukcí Q_B , PI_{TOTAL} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukcí koncových akceptorů PSI) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. r.j. ... relativní jednotky.

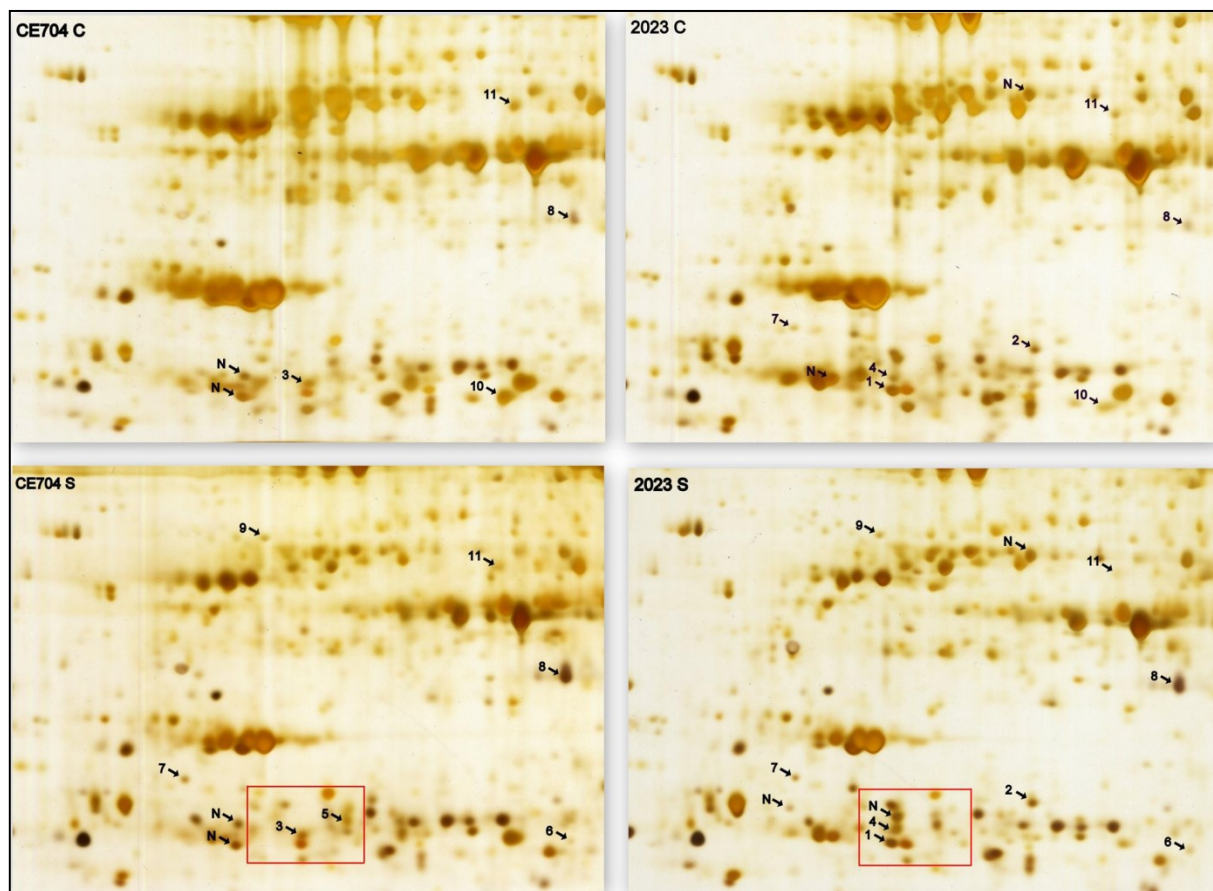


Obr. 18. Časová závislost (OJIP křivka) fluorescence chlorofylu (F_t), křivky diferenční kinetiky v oblasti mezi inflexními body O a I (ΔW_{OI}), O a J (ΔW_{OJ}), O a K (ΔW_{OK}), relativní variabilní fluorescence chlorofylu mezi body I a P s maximální amplitudou fixovanou jako 1 (W_{IP}) a část křivky relativní variabilní fluorescence chlorofylu mezi body O a I s hodnotami vyššími než 1 (W_{OI}) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). r.j. ... relativní jednotky.



Změny proteomu vzniklé vlivem stresu suchem jsem analyzovala dvěma nezávislými přístupy, a to 2-DGE a iTRAQ. Analýzou 2-DGE bylo rozlišeno přibližně 300 skvrn, které byly na gelech jasně viditelné (**Obr. 19**). Mezi nimi vykazovalo 17 skvrn silné rozdíly mezi genotypy nebo mezi stresovanými a kontrolními rostlinami buď v přítomnosti/pozici na gelu či v intenzitě. Z těchto skvrn se podařilo identifikovat 11 proteinů, které jsou uvedeny v **Tab. 30**. Analýzou iTRAQ se podařilo odhalit 1244 unikátních peptidů, z nichž bylo 326 identifikováno prostřednictvím proteinové databáze NCBI a 1164 pomocí NCBI EST databáze (s překryvem 245 peptidů) (**Příloha 2**). Proteinů, jejichž hladina se zvýšila/snížila v důsledku sucha minimálně dvojnásobně alespoň u jednoho z genotypů, a dále proteinů, jejichž hladina se u jednotlivých genotypů měnila odlišně (opět minimálně s dvojnásobným rozdílem), bylo celkem 220. Tyto proteiny byly rozřazeny do 13 skupin podle jejich funkce (**Obr. 20, 21, Příloha 2**). Vedle proteinů s různými a neznámými funkcemi, které byly zařazeny do skupiny Ostatní (21 % z celkového počtu proteinů reagujících na stres), byly dalšími nejzastoupenějšími skupinami chaperony (18 %), jejichž množství se vlivem sucha v listech obou genotypů zvyšovalo, a dále dvě skupiny proteinů energetického metabolismu, a to proteiny primárních fotosyntetických procesů (10 %) a proteiny sacharidového metabolismu včetně enzymů katalyzujících sekundární fotosyntetické reakce (10 %). Proteiny podílející se na genové expresi a její regulaci představovaly dalších 12 % z celkového počtu proteinů reagujících na stres. Ostatní kategorie byly zastoupeny méně a každá z nich představovala méně než 7 % celkových proteinů reagujících na stres.

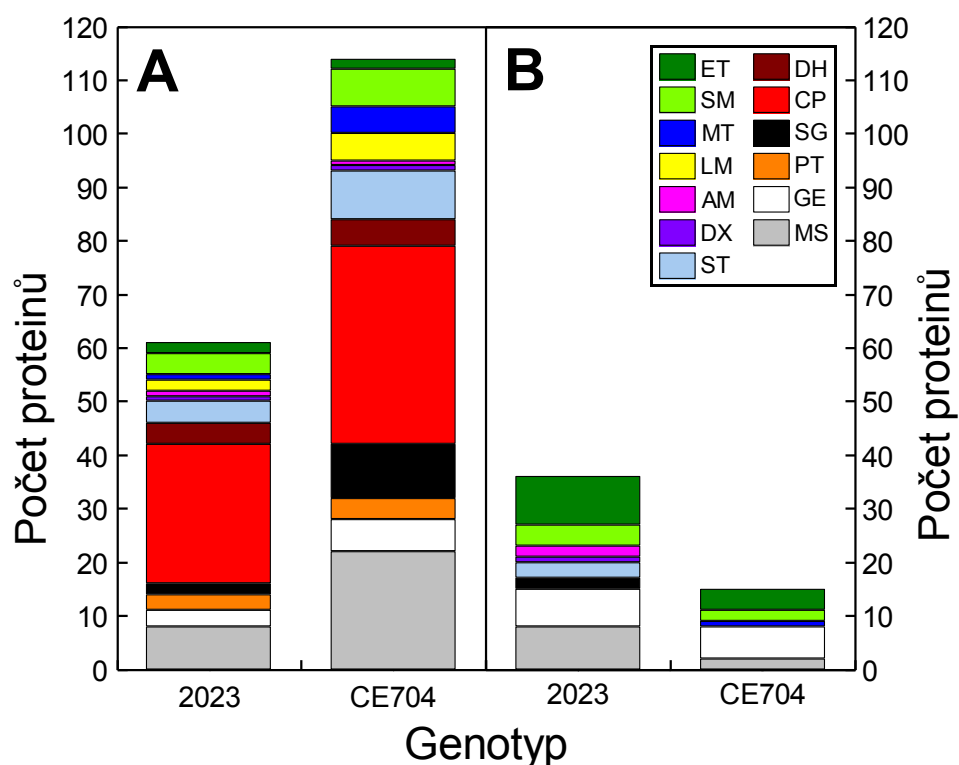
Obr. 19. Reprezentativní gely z 2-DGE, ukazující proteom listů dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (C) nebo vystavených vodnímu deficitu (S) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Na obrázcích jsou jenom ty části gelů, v nichž byly nalezeny rozdíly mezi jednotlivými variantami (genotyp, způsob pěstování), a skvrny reprezentující proteiny, v nichž byly tyto rozdíly zjištěny, jsou označeny šipkou a číslicemi 1-11; tyto číslice odpovídají identifikačním číslům proteinů uvedeným v **Tab. 30. Červené rámečky zvýrazňují rozdíly v zastoupení dvou izoform HSP26 proteinů (skvrny č. 3 a 4) mezi stresovanými rostlinami linií 2023 a CE704. N ... neidentifikovaný protein.**



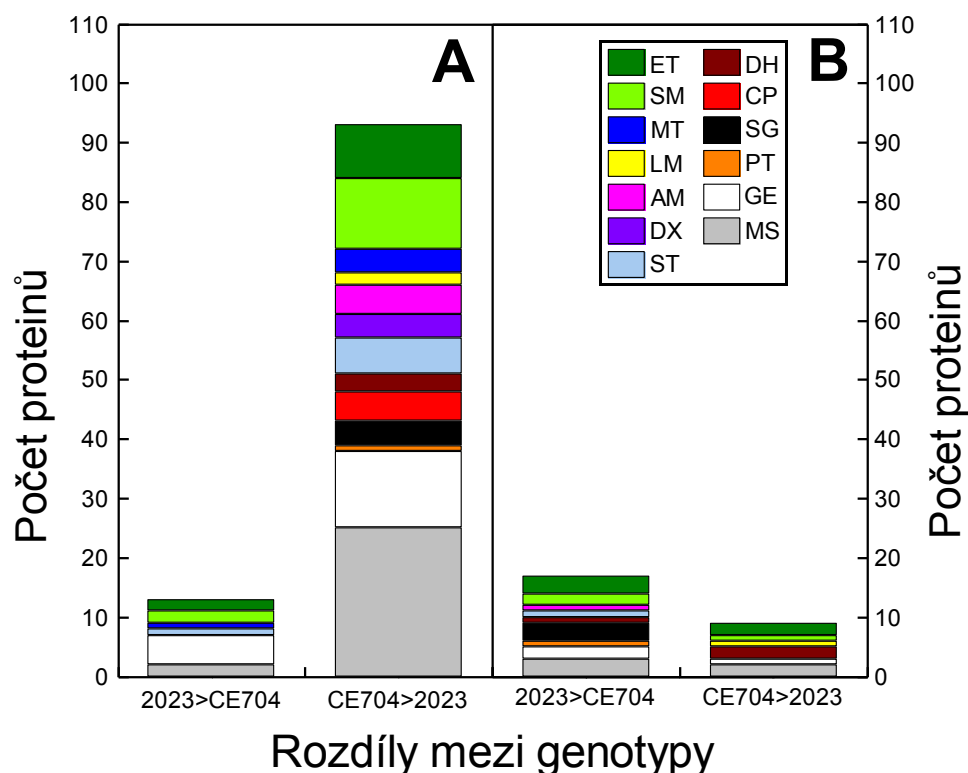
Tab. 30. Proteiny, u nichž byly 2-DGE analýzou listového proteomu nalezeny rozdíly mezi rostlinami inbredních linií kukuřice 2023 (P1) a CE704 (P2) pěstovanými v podmínkách dostatku vody (C) nebo vystavenými vodnímu deficitu (S) po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Číslo skvrny odpovídá **Obr. 19**. Symboly + a – označují intenzitu jednotlivých proteinových skvrn: – ... protein chybí, +/- ... velmi slabá intenzita, + ... střední intenzita, ++ ... vysoká intenzita. Uvedena je sekvence, podle níž byl protein identifikován, a dále nejbližší známý homolog spolu s rostlinným druhem, u něhož byla tato identifikace provedena (*AT* ... *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *OS* ... *Oryza sativa* L., *SL* ... *Solanum lycopersicum* Mill., *TA* ... *Triticum aestivum* L., *ZM* ... *Zea mays* L.). CP ... chaperony, DX ... detoxifikační proteiny, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce, MS ... různé proteiny, SM ... proteiny účastníci se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂), ST ... stresové proteiny.

| Číslo skvrny | Protein | P1 C | P1 S | P2 C | P2 S | Sekvence (EST/protein/GSS) | Nejbližší homolog se známou funkcí | Druh | Funkční kategorie |
|--------------|----------------------------|------|------|------|------|----------------------------|------------------------------------|------|-------------------|
| 1 | Chaperonin 20 | + | + | – | – | gi 91049630 | gb AF233745.1 AF233745 | SL | CP |
| 2 | Glutathion-S-transferáza | + | ++ | – | – | gi 162462462 | gi 162462462 | ZM | DX |
| 3 | Triózfosfátizomeráza | – | – | + | ++ | gi 91056160 | gb EU959275.1 | ZM | SM |
| 4 | Heat shock protein 26 | +/- | + | – | – | gi 162461165 | gi 162461165 | ZM | CP |
| 5 | Heat shock protein 26 | – | – | – | + | gi 162461165 | gi 162461165 | ZM | CP |
| 6 | Glutathion-S-transferáza | – | + | – | + | gi 162458026 | gi 162458026 | ZM | DX |
| 7 | IN2-1 protein | +/- | + | – | + | gi 148938867 | ref NM_001155003.1 | ZM | MS |
| 8 | Protein reagující na stres | + | ++ | + | ++ | gi 149004623 | gb DQ022951.1 | TA | ST |
| 9 | Aktiváza Rubisco | – | + | – | + | gi 34813618 | gb AF305876.2 | ZM | SM |
| 10 | PsbP podjednotka PSII | + | – | + | – | gi 101383936 | gb AF052203.1 AF052203 | OS | ET |
| 11 | Fruktózobisfosfátaldoláza | + | +/- | ++ | +/- | gi 93014815 | ref NM_001036644.2 | AT | SM |

Obr. 20. Funkční klasifikace proteinů, u nichž byly iTRAQ analýzou listového proteomu nalezeny u rostlin inbredních linií kukuřice 2023 a CE704 změny v důsledku vystavení vodnímu deficitu po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou počty proteinů v jednotlivých kategoriích, které vykazovaly zvýšené (A) nebo snížené (B) množství v důsledku sucha, přičemž započítány byly pouze proteiny, v nichž byl příslušný iTRAQ poměr $\geq 2,0$. AM ... proteiny účastníci se metabolismu aminokyselin, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce a syntézy chlorofylu, CP ... chaperony, DH ... dehydriny, DX ... detoxifikační proteiny, GE ... proteiny účastníci se genové exprese a její regulace, LM ... proteiny účastníci se metabolismu lipidů, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastníci se transportu různých látek, PT ... proteázy a jejich inhibitory, SG ... proteiny účastníci se buněčné signalizace, SM ... proteiny účastníci se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂), ST ... stresové proteiny.



Obr. 21. Funkční klasifikace proteinů, u nichž byly změny v důsledku vystavení vodnímu deficitu po dobu 6 dnů od začátku stresové periody nalezené iTRAQ analýzou listového proteomu závislé na hodnoceném genotypu (inbrední linie kukuřice 2023 a CE704). Uvedeny jsou počty proteinů v jednotlivých kategoriích, které vykazovaly zvýšené množství u jednoho genotypu a snížené množství v důsledku sucha u druhého genotypu nebo *vice versa* (A), a dále počty těchto proteinů, v nichž se oba hodnocené genotypy lišily i u kontrolních rostlin (B). 2023 > CE704: zvýšené množství u linie 2023 and snížené množství u CE704 (panel A) nebo vyšší množství u kontrolních rostlin CE704 ve srovnání s 2023 (panel B); CE704 > 2023: zvýšené množství u linie CE704 and snížené množství u 2023 (panel A) nebo vyšší množství u kontrolních rostlin 2023 ve srovnání s CE704 (panel B). Započítány byly pouze proteiny, v nichž byl příslušný iTRAQ poměr $\geq 2,0$. AM ... proteiny účastnící se metabolismu aminokyselin, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce a syntézy chlorofylu, CP ... chaperony, DH ... dehydriny, DX ... detoxifikační proteiny, GE ... proteiny účastnící se genové exprese a její regulace, LM ... proteiny účastnící se metabolismu lipidů, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastnící se transportu různých látek, PT ... proteázy a jejich inhibitory, SG ... proteiny účastnící se buněčné signalizace, SM ... proteiny účastnící se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂), ST ... stresové proteiny.



Přibližně polovina proteinů identifikovaných iTRAQ a vykazujících alespoň dvojnásobný rozdíl v množství mezi kontrolními a stresovanými rostlinami reagovala na stres suchem podobně v obou genotypech. Celkový počet proteinů, jejichž hladina byla minimálně dvojnásobně zvýšena, byl však mnohem vyšší u linie CE704 (114 proteinů) ve srovnání s linií 2023 (61 proteinů) (Obr. 20A), a pro proteiny, jejichž hladina byla v důsledku sucha snížena, byla situace opačná (15 proteinů u CE704, 36 proteinů u 2023) (Obr. 20B). Deset proteinů s nejextrémnější odpovědí na stres suchem u každého genotypu je uvedeno v Tab. 31. V případě proteinů se zvýšeným množstvím v důsledku sucha se s jednou výjimkou jednalo o shodné proteiny, z nichž většina patřila do skupiny chaperonů (Tab. 31). Proteiny, jejichž hladina byla u stresovaných rostlin nejvíce snížena, se naopak lišily mezi genotypy a patřily do skupin regulace genové exprese, fotosyntetického transportu elektronů a metabolismu sacharidů (Tab. 31).

Tab. 31. Deset proteinů, u nichž byly iTRAQ analýzou listového proteomu u inbredních linií kukuřice 2023 a CE704 nalezeny nejvýraznější rozdíly mezi rostlinami pěstovanými v podmínkách dostatku vody nebo vystavenými vodnímu deficitu po dobu 6 dnů od začátku stresové periody (pět proteinů, u nichž došlo ke zvýšení množství, pět proteinů, u nichž došlo ke snížení množství v důsledku sucha; seřazeno jak podle linie 2023, tak podle linie CE704). Čísla ve sloupcích “2023” a “CE704” představují vždy konkrétní rozdíl mezi stresovanými (S) a kontrolními (C) rostlinami (poměr iTRAQ vyjádřený jako poměr S/C ; pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila, byl použit poměr $-1/(S/C)$). Uvedena je sekvence, podle níž byl protein identifikován, a dále nejbližší známý homolog spolu s rostlinným druhem, u něhož byla tato identifikace provedena (ZM ... *Zea mays* L.). CP ... chaperony, DH ... dehydriny, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce, GE ... proteiny účastníci se genové exprese a její regulace, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastníci se transportu různých látek, ST ... stresové proteiny.

| Protein | 2023 | CE704 | Sekvence (EST/protein/GSS) | Nejbližší homolog se známou funkcí | Druh | Funkční kategorie |
|--|------|-------|----------------------------|------------------------------------|------|-------------------|
| Seřazeno podle inbrední linie 2023 | | | | | | |
| Dehydrin RAB17 | 15,0 | 30,1 | gi 149074542 | ref NM_001111949.1 | ZM | DH |
| Malý heat shock protein | 7,7 | 13,6 | gi 92088239 | ref NM_001157311.1 | ZM | CP |
| Dehydrin RAB-17 | 6,9 | 16,2 | gi 239236 | gi 239236 | ZM | DH |
| Hypotetický protein | 6,1 | 13,0 | gi 23928441 | gi 23928441 | ZM | MS |
| Malý heat shock protein | 6,0 | 8,3 | gi 149109747 | gb EU962980.1 | ZM | CP |
| Elongační faktor eEF1D | -5,2 | 1,9 | gi 116814898 | ref NM_001155791.1 | ZM | GE |
| Nukleozidtrifosfatáza (analog disease-resistance proteinu PIC15) | -3,4 | 1,2 | gi 3982622 | gi 3982622 | ZM | ST |
| Ferredoxin | -3,2 | 1,2 | gi 48374987 | gi 48374987 | ZM | ET |
| Ribonukleoprotein A | -3,1 | -2,8 | gi 149083997 | gb EU972036.1 | ZM | GE |
| Fosfatáza PHOSPHO1 (fosfoetanolamin/fosfocholin fosfatáza) | -3,0 | -2,3 | gi 149104232 | gb EU953126.1 | ZM | MS |
| Seřazeno podle inbrední linie CE704 | | | | | | |
| Dehydrin RAB-17 | 15,0 | 30,1 | gi 149074542 | ref NM_001111949.1 | ZM | DH |
| Dehydrin RAB-17 | 6,9 | 16,2 | gi 239236 | gi 239236 | ZM | DH |
| Hypotetický protein | 4,4 | 14,2 | gi 148953111 | gb EU953517.1 | ZM | MS |
| Malý heat shock protein | 7,7 | 13,6 | gi 92088239 | ref NM_001157311.1 | ZM | CP |
| Hypotetický protein | 6,1 | 13,0 | gi 23928441 | gi 23928441 | ZM | MS |
| Ribonukleoprotein A | -2,1 | -4,6 | gi 149065598 | ref NM_001158256.1 | ZM | GE |
| Protein s doménou “AT-hook” | -1,6 | -3,2 | gi 148955887 | gb EU959419.1 | ZM | GE |
| Protein přenášející sacharidy | 1,5 | -3,0 | gi 148966293 | ref NM_001154535.1 | ZM | MT |
| Protein s doménou “WD-repeat” | 1,5 | -3,0 | gi 89247710 | gb EU958180.1 | ZM | GE |
| Protein podobný nicotinátfosforibozyltransferáze | 1,5 | -3,0 | gi 101398157 | ref NM_001159021.1 | ZM | MS |

Celkem 106 z 220 rozdílně exprimovaných a identifikovaných proteinů bylo suchem indukováno v jednom genotypu a potlačeno ve druhém nebo naopak. Genotyp CE704 byl obvykle charakterizován zvýšením hladiny těchto proteinů a 2023 jejím snížením (**Obr. 21A**) a 26 z těchto proteinů vykazovalo významné rozdíly mezi genotypy dokonce i u kontrolních rostlin (**Obr. 21B**). Proteiny, jejichž reakce se nejvíce lišila mezi genotypy, jsou uvedeny v **Tab. 32**.

Tab. 32. Deset proteinů, u nichž byly iTRAQ analýzou listového proteomu nalezeny nejvýraznější rozdíly mezi reakcí u inbredních linií kukuřice 2023 a CE704 na vystavení vodnímu deficitu po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Čísla ve sloupcích “2023” a “CE704” představují vždy konkrétní rozdíl mezi stresovanými (S) a kontrolními (C) rostlinami (poměr iTRAQ vyjádřený jako poměr S/C; pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila, byl použit poměr -1/(S/C)), čísla ve sloupci “Kontrast” představují odvozený poměr iTRAQ založený na rozdílné reakci obou genotypů. Uvedena je sekvence, podle níž byl protein identifikován, a dále nejbližší známý homolog spolu s rostlinným druhem, u něhož byla tato identifikace provedena (AT = *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., ZM ... *Zea mays* L.). ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce, GE ... proteiny účastníci se genové exprese a její regulace, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastníci se transportu různých látek, SM ... proteiny účastníci se metabolismu sacharidů.

| Protein | 2023 | CE704 | Kontrast | Sekvence (EST/protein/GSS) | Nejbližší homolog se známou funkcí | Druh | Funkční kategorie |
|---|------|-------|----------|----------------------------|------------------------------------|------|-------------------|
| Proteiny se zvýšeným množstvím u inbrední linie CE704 a sníženým množstvím u inbrední linie 2023 | | | | | | | |
| Elongační faktor eEF1D | -5,2 | 1,9 | 9,8 | gi 116814898 | ref NM_001155791.1 | ZM | GE |
| Hydroláza (α/β rodina) | -2,3 | 3,8 | 8,8 | gi 149074075 | ref NM_119816.4 | AT | MS |
| Protein „KDE-like“ (cyclicin) | -2,0 | 3,3 | 6,7 | gi 113703231 | ref NM_001155938.1 | ZM | MS |
| Inhibitor xylanázy (TAXI-IV) | -1,8 | 3,5 | 6,2 | gi 149112160 | gb EU976729.1 | ZM | SM |
| PsaK (podjednotka PSI) | -2,5 | 2,1 | 5,0 | gi 149205590 | gb EU967431.1 | ZM | ET |
| Proteiny se zvýšeným množstvím u inbrední linie 2023 a sníženým množstvím u inbrední linie CE704 | | | | | | | |
| Transaldoláza | 1,7 | -1,7 | -2,9 | gi 149099949 | ref NM_001157202.1 | ZM | SM |
| Ribozomální protein S18 | 2,2 | -1,4 | -3,0 | gi 166528395/gi 11467213 | gi 11467213 | ZM | GE |
| Protein podobný nicotinátfosforibozyltransferáze | 1,5 | -3,0 | -4,5 | gi 101398157 | ref NM_001159021.1 | ZM | MS |
| Protein s doménou „WD-repeat“ | 1,5 | -3,0 | -4,5 | gi 89247710 | gb EU958180.1 | ZM | GE |
| Protein přenášející sacharidy | 1,5 | -3,0 | -4,5 | gi 148966293 | ref NM_001154535.1 | ZM | MT |

Když jsem se při hodnocení výsledků iTRAQ analýzy zaměřila konkrétně na proteiny související s fotosyntetickými procesy, zaznamenala jsem mezi rostlinami rodičovských linií pěstovanými v kontrolních podmínkách v obsahu těchto proteinů pouze malé rozdíly. Po vystavení vodnímu deficitu však většinou oba genotypy reagovaly na stres odlišným způsobem a opět zde byla patrná příznivější reakce genotypu CE704. Ve srovnání s genotypem 2023 se u genotypu CE704 hladiny fotosyntetických proteinů v důsledku sucha spíše zvyšovaly než klesaly, případně se snižovaly menší měrou než u genotypu 2023 (**Tab. 33, Příloha 2**).

Hladina LHC proteinů se za kontrolních podmínek mezi genotypy významně nelišila, avšak mírné zvýšení hladiny u linie CE704 a naopak mírný pokles u linie 2023 během dehydratace měly za následek výrazně rozdílnou reakci těchto proteinů na stres suchem. Podobně tomu bylo i u 33kDa proteinu OEC PSII, PsbO. Příznivější reakci na stres u genotypu CE704 bylo možné pozorovat i u dvou proteinů PSI (PsaK a protein identifikovaný jako některá z podjednotek PSI vázající Fe-S centrum) či jedné podjednotky CF0 komplexu chloroplastové ATP-syntázy. iTRAQ analýzou se dále podařilo identifikovat také dvě izoformy ferredoxinu, z nichž jedna byla v důsledku sucha u linie CE704 indukována a druhá měla naopak sníženou expresi u linie 2023, a dále dvě izoformy plastocyaninu, jejichž množství u linie 2023 vlivem sucha pokleslo, zatímco u CE704 zůstalo na úrovni kontrolních rostlin (**Tab. 33**).

V kategorii proteinů primárních fotosyntetických dějů jsem identifikovala i proteiny se shodnou reakcí na stres u obou genotypů, např. protein PsbP (23 kDa protein OEC) a dvě izoformy PetH (FNR), jejichž obsah u obou linií během dehydratace významně klesl. Také bylo možno nalézt proteiny, u nichž na stres reagoval pouze genotyp 2023; jednalo se o protein PsaB, tj. hlavní podjednotku PSI, a PsbB – součást vnitřní světlosběrné antény PSII. V kontrolních podmínkách jsem u genotypu 2023 pozorovala nižší množství těchto proteinů v porovnání s genotypem CE704, během periody sucha však jejich hladina u genotypu 2023 narostla, a tak se obsah u obou genotypů vyrovnal (**Tab. 33**).

U linie CE704 byla suchem indukována také exprese několika enzymů podílejících se na fotosyntetické fixaci uhlíku, a to NADP-MDH, α podjednotky RSBP, a zejména RCA. U linie 2023 se hladina těchto proteinů u stresovaných rostlin nelišila od kontrolních (s výjimkou RCA, jejíž hladina byla zvýšena), naopak jsem zaznamenala mírný pokles množství velké podjednotky Rubisco (**Tab. 33**).

Tab. 33. Schematické znázornění rozdílů v množství fotosyntetických proteinů, nalezených iTRAQ analýzou listového proteomu u inbredních linií kukuřice 2023 (P1) a CE704 (P2) v důsledku vystavení rostlin vodnímu deficitu po dobu 6 dnů od začátku stresové periody. Odpověď jednotlivých genotypů na stres suchem je u jednotlivých genotypů vyjádřena jako poměr S/C , kde S představuje stresované rostliny a C představuje kontrolní rostliny; pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila, byl použit poměr $-1/(S/C)$. Pro srovnání odlišného chování genotypů v rámci jednoho způsobu pěstování byly použity poměry $P2/P1$, kde $P1$ a $P2$ jsou srovnávané genotypy; pokud byla vyšší hladina proteinů u druhého genotypu, byly tyto poměry vyjádřeny jako $-1/(P2/P1)$. $\Delta P2$ představuje poměr S/C pro genotyp $P2$, $\Delta P1$ představuje poměr S/C pro genotyp $P1$. Vysvětlení barevné symboliky je uvedeno na konci tabulky. OEC ... komplex vyvíjející kyslík.

| Protein | S / C | | C | S | $\frac{\Delta P2}{\Delta P1}$ |
|---|-------|----|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| | P1 | P2 | $\frac{P2}{P1}$ | $\frac{P2}{P1}$ | |
| Syntéza / přeměna fotosyntetických pigmentů | | | | | |
| Protochlorofylidreduktáza B | | | | | |
| Komplexy světlosběrných antén | | | | | |
| Lhcb4 (CP29 protein světlosběrné antény fotosystému II) | | | | | |
| Lhcb4 (CP29 protein světlosběrné antény fotosystému II) | | | | | |
| Lhcb5 (CP26 protein světlosběrné antény fotosystému II) | | | | | |
| Blíže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | |
| Fotosystém II | | | | | |
| PsbB (CP47 protein vnitřní světlosběrné antény) | | | | | |
| PsbO (33kDa protein OEC) | | | | | |
| PsbP (23 kDa protein OEC) | | | | | |
| Fotosystém I | | | | | |
| PsaB | | | | | |
| PsaK | | | | | |
| Některá z podjednotek PSI vázající Fe-S centrum | | | | | |
| Ferredoxin a oxidoreduktázy závislé na ferredoxinu | | | | | |
| Zřejmě PetF (ferredoxin) | | | | | |
| PetF (ferredoxin) | | | | | |
| PetH (ferredoxin-NADP oxidoreduktáza) | | | | | |
| PetH (ferredoxin-NADP oxidoreduktáza) | | | | | |
| Plastocyanin | | | | | |
| Plastocyanin | | | | | |
| Plastocyanin | | | | | |
| ATP-syntáza | | | | | |
| AtpF (podjednotka I CF0) | | | | | |
| Enzymy Calvinova cyklu (a jejich regulační proteiny) | | | | | |
| RbcL (velká podjednotka Rubisco) | | | | | |
| Aktiváza Rubisco | | | | | |
| α podjednotka RSBP (chaperon Rubisco) | | | | | |
| Transaldoláza | | | | | |
| Enzymy C4 cyklu | | | | | |
| NADP-malátdehydrogenáza | | | | | |

Rozdíl mezi jednotlivými experimentálními variantami je v rozmezí:

| | | |
|-----------|--------|----------|
| ≤ -2 | (2; 4) | ≥ 4 |
|-----------|--------|----------|

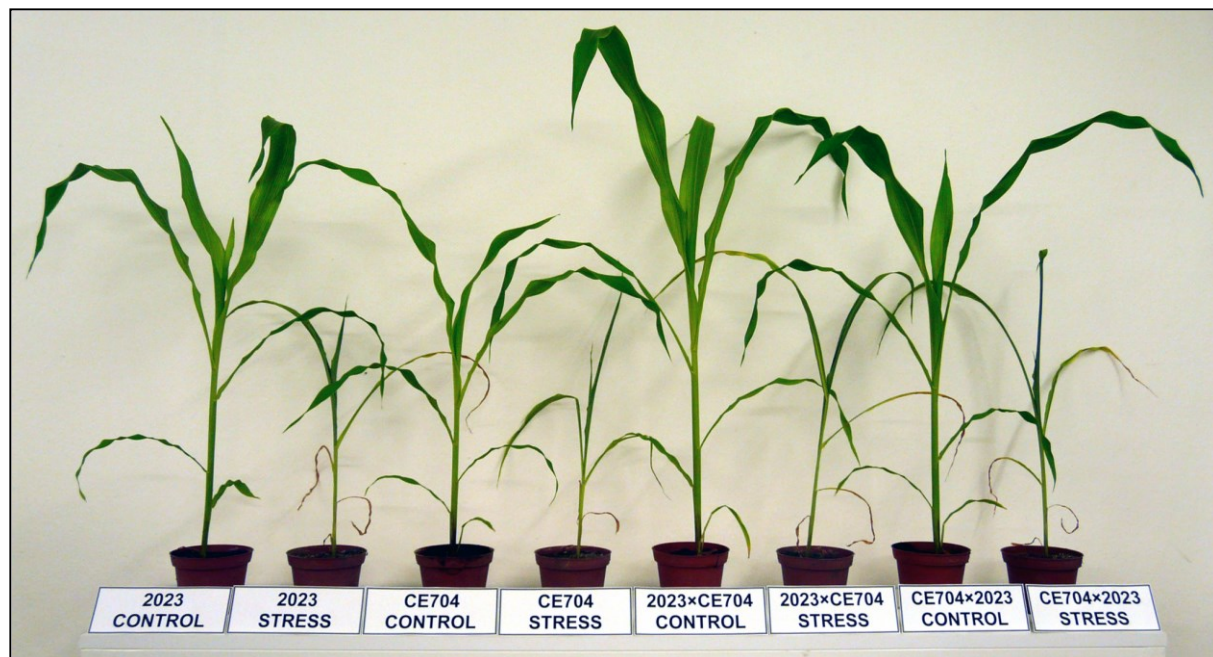
Srovnání proteinů identifikovaných pomocí 2-DGE s proteiny získanými analýzou iTRAQ ukázalo pouze omezený překryv výsledků těchto metod. Pouze 4 proteiny z 11 proteinů identifikovaných 2-DGE byly nalezeny také analýzou iTRAQ: GST27, RCA, PsbP a sHSP26. Změny hladin těchto proteinů detekované pomocí analýzy iTRAQ byly podobné výsledkům získaných z 2-DGE. 2-DGE však také odhalila dvě izofomy sHSP26, které reagovaly na stres suchem různým způsobem v závislosti na genotypu (**Obr. 19**), kdežto dvě izofomy sHSP26 identifikované iTRAQ měly u obou genotypů v důsledku sucha zvýšenou hladinu. iTRAQ analýzou se podařilo odhalit i různé izofomy několika dalších proteinů, jejichž množství se u stresovaných rostlin snížilo; největší počet izoforem jsem pozorovala u proteinů typu HSP70 a 14-3-3 (**Příloha 2**).

4.5. Experimentální celek 5

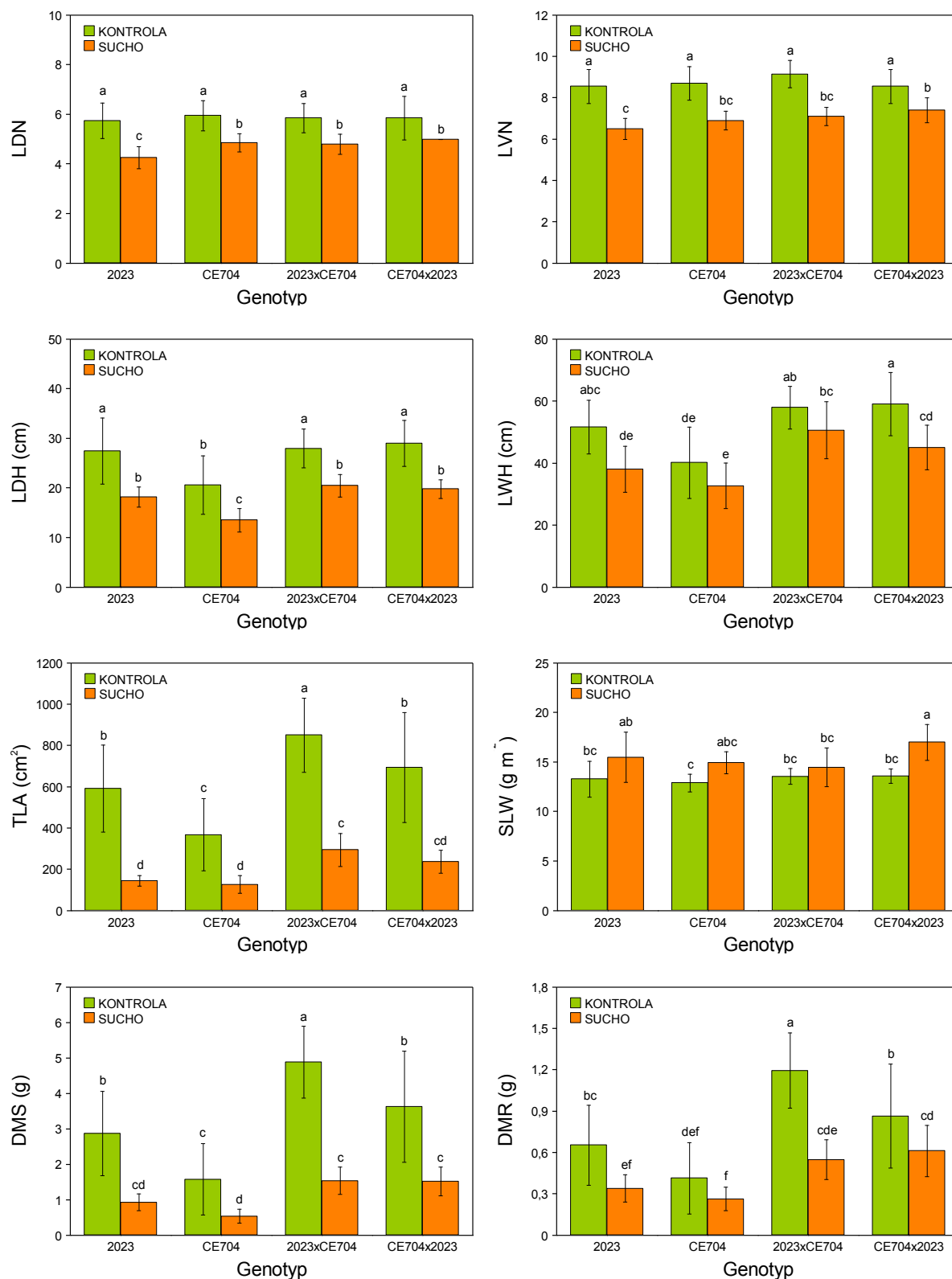
V posledním celku experimentů byla detailní analýza morfologických, fyziologických a biochemických charakteristik (opět se zaměřením především na fotosyntézu) spolu s analýzou listového proteomu pomocí iTRAQ provedena nejen u kontrastních inbredních linií kukuřice (2023 a CE704), ale i u jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023). Délka období bez zalévání byla v tomto případě prodloužena na 10 dnů a jednalo se tedy o středně silný až silný stres suchem (volumetrický obsah vody v půdě byl u všech čtyř hodnocených genotypů nulový, resp. neměřitelný).

Stres suchem měl výrazný vliv na morfologii a vývoj pokusných rostlin všech čtyř genotypů (**Obr. 22**). LDN byl u stresovaných rostlin významně nižší (zejména u rodičovské linie 2023) než u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách, kdy měly všechny čtyři genotypy stejný počet plně vyvinutých listů, a totéž platilo pro LVN (**Obr. 23**). Celkově nejmenší vzrůst vykazoval genotyp CE704, u něhož byly hodnoty LDH i LWH v kontrolních podmínkách výrazně nižší než u ostatních genotypů, a tato situace zůstala zachována i u stresovaných rostlin, které měly ve srovnání s kontrolou statisticky průkazně nižší hodnoty LDH i LWH (v druhém případě byl rozdíl mezi kontrolou a stresem statisticky průkazný pouze u linie 2023 a křížence 2023×CE704) (**Obr. 23**). Totéž platilo i pro TLA, která se v důsledku sucha zvláště výrazně snížila u všech genotypů, nejméně však u CE704 (**Obr. 23**). Hodnoty SLW byly u kontrolních rostlin všech genotypů na stejné úrovni, stres suchem tento parametr mírně zvýšil, statisticky průkazně však pouze u genotypu CE704×2023 (**Obr. 23**). DMS i DMR byly v kontrolních podmínkách nejvyšší u křížence 2023×CE704 a nejnižší u rodičovské linie CE704 (**Obr. 23**). V podmínkách sucha byla DMS významně nižší a její hodnoty se mezi genotypy statisticky průkazně nelišily s výjimkou linie CE704, u níž byly opět nejnižší, což souviselo s celkově malým vzrůstem tohoto genotypu (**Obr. 22, 23**). DMR se u rostlin vystavených vodnímu deficitu nejvíce lišila od kontrolních hodnot u křížence 2023×CE704, naopak u CE704 nebyl rozdíl v tomto parametru mezi kontrolními a stresovanými rostlinami statisticky významný. Oba kříženci vykazovali vyšší hodnoty DMR než jejich rodiče, a to jak u kontrolních rostlin, tak u rostlin, které nebyly po dobu 10 dnů zalévány (**Obr. 23**).

Obr. 22. Vzhled pokusných rostlin dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody („Control“), nebo vystavených vodnímu deficitu („Stress“) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody.

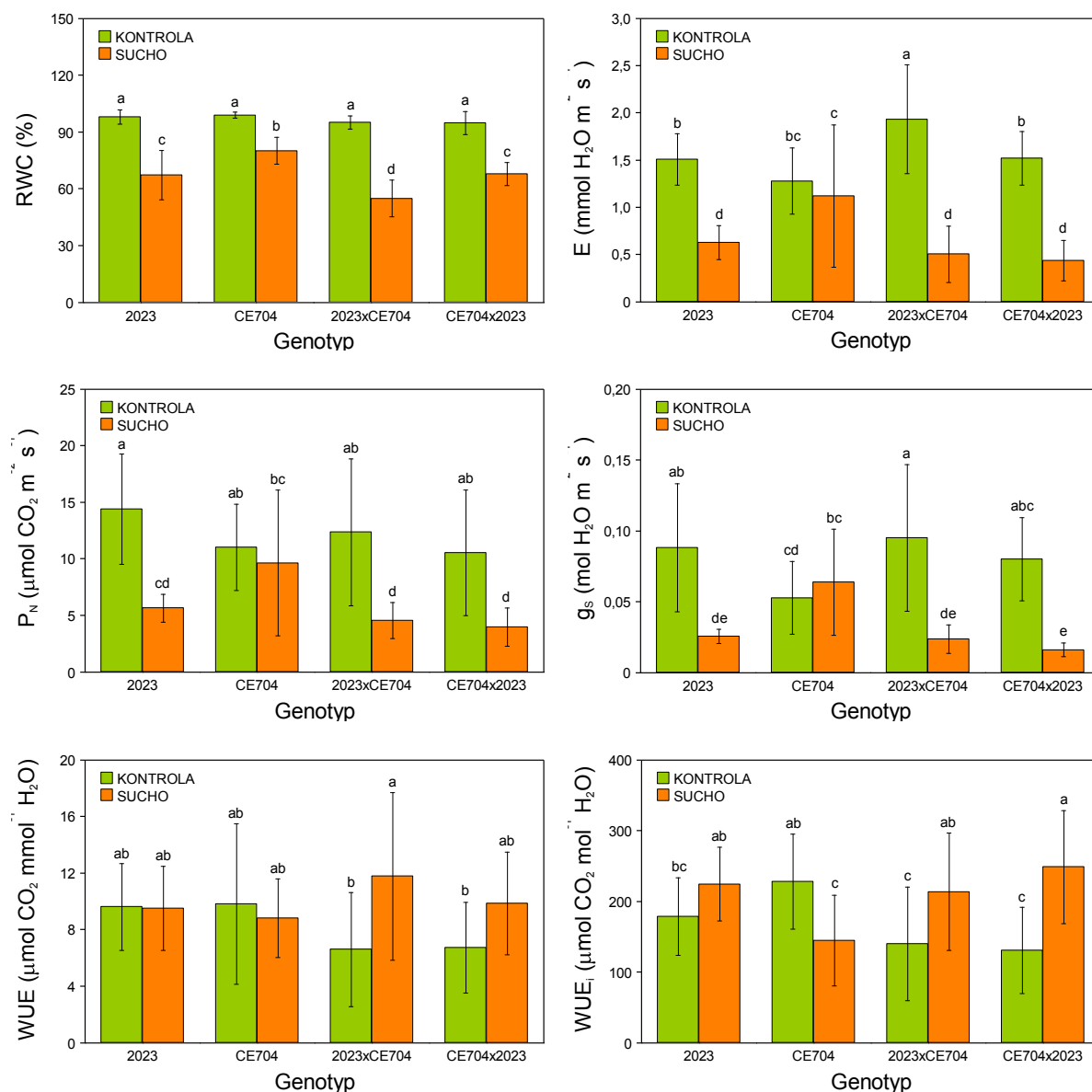


Obr. 23. Vybrané morfologické charakteristiky rostlin (LDN ... počet plně vyvinutých listů, LVN ... počet všech viditelných listů, LDH ... výška rostliny stanovená k jazýčku nejmladšího plně vyvinutého listu, LWH ... výška rostliny stanovená ke špičce listu viditelného ve vrcholové růžici, TLA ... celková plocha všech alespoň částečně fotosyntetizujících listů (zahrnutý jen plně vyvinutý listy), SLW ... specifická hmotnost 4. listu, DMS ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, DMR ... hmotnost sušiny kořenů rostlin) **u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody.** Uvedeny jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 20). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



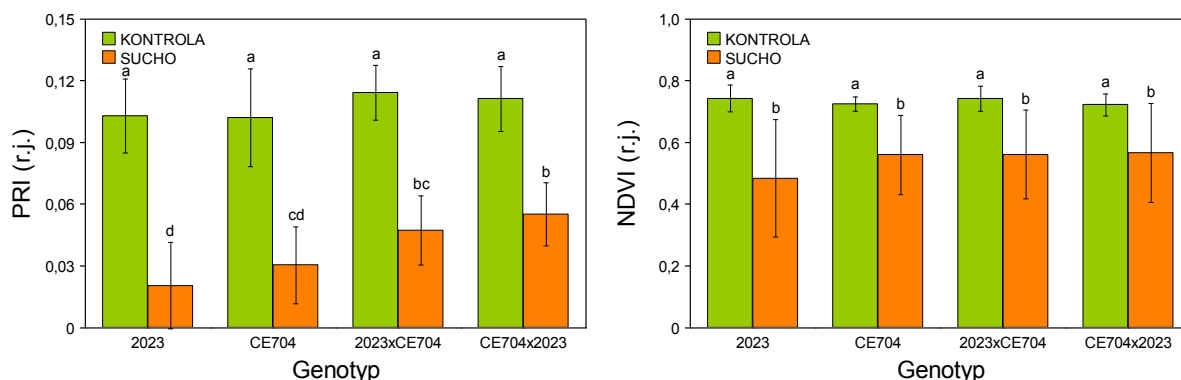
RWC se u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách mezi studovanými genotypy nelišil; vlivem sucha došlo u všech genotypů k poklesu hodnot této charakteristiky, přičemž nejmenší snížení RWC jsem zaznamenala u linie CE704, naopak největší u křížence 2023×CE704 (**Obr. 24**). V charakteristikách E a g_s se nejvyšší hodnotou při normální dostupnosti vody vyznačoval genotyp 2023×CE704 (statisticky významný rozdíl od ostatních genotypů byl ale pouze v E) a nejnižší hodnotou rodičovská linie CE704 (statisticky významný rozdíl naopak pouze v g_s). V podmínkách sucha se hodnoty obou těchto charakteristik průkazně snížily u všech genotypů (více u kříženců) s výjimkou CE704, u níž se hodnoty obou charakteristik u rostlin stresovaných suchem nelišily od kontrolních rostlin (**Obr. 24**). Také v případě P_N jsem u stresovaných rostlin všech genotypů s výjimkou CE704 pozorovala výrazný pokles hodnot (**Obr. 24**). WUE se lišila u stresovaných rostlin v porovnání s kontrolou pouze u kříženců, u nichž došlo k nárůstu hodnot tohoto parametru (statisticky průkaznému ovšem pouze u 2023×CE704); WUE_i se při stresu zvýšila také pouze u kříženců (nárůst pozorovaný u linie 2023 nebyl statisticky průkazný), naopak u genotypu CE704 se statisticky průkazně snížila (**Obr. 24**).

Obr. 24. Vybrané charakteristiky vodního režimu rostlin a výměny plynů (RWC ... relativní obsah vody, P_N ... čistá rychlost fotosyntézy, E ... rychlost transpirace, g_s ... vodivost průduchů, WUE ... „okamžitá“ efektivita využití vody, WUE_i ... „vnitřní“ efektivita využití vody) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



Hodnoty PRI a NDVI, sloužící k přibližnému stanovení obsahu chlorofylů (NDVI) a efektivity využití světelného toku a epoxidačního stavu pigmentů xantofylového cyklu, příp. poměru mezi karotenoidy a chlorofyly (PRI), se za optimálních podmínek mezi genotypy nelišily (**Obr. 25**). U stresovaných rostlin došlo u NDVI k poklesu hodnot u všech genotypů stejnou měrou, v případě PRI jsem také zaznamenala průkazný pokles, největší u genotypu 2023 a nejmenší u obou F1 kříženců (**Obr. 25**).

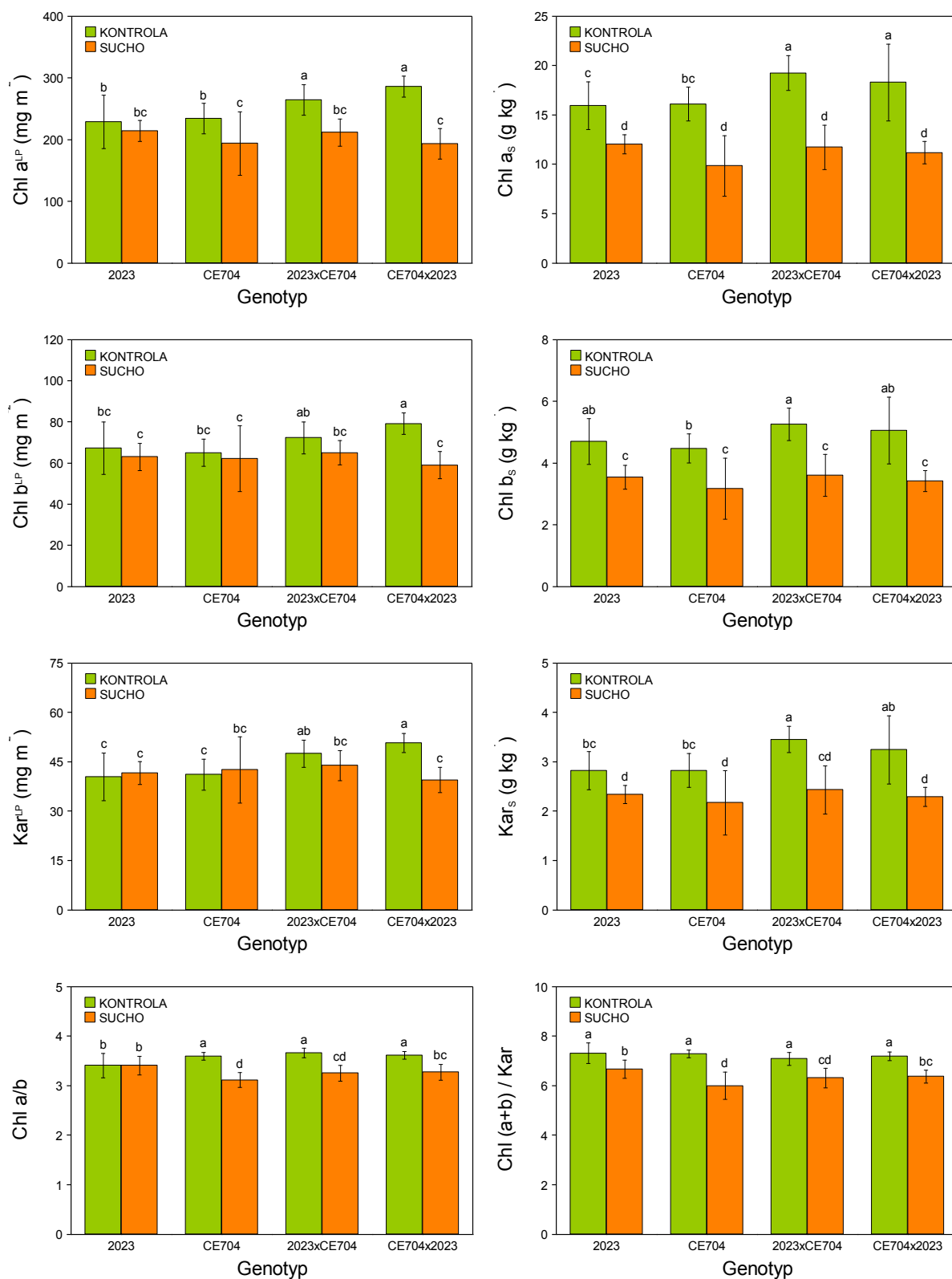
Obr. 25. Fotochemický reflektanční index (PRI) a normalizovaný diferenční vegetační index (NDVI) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. r.j. ... relativní jednotky.



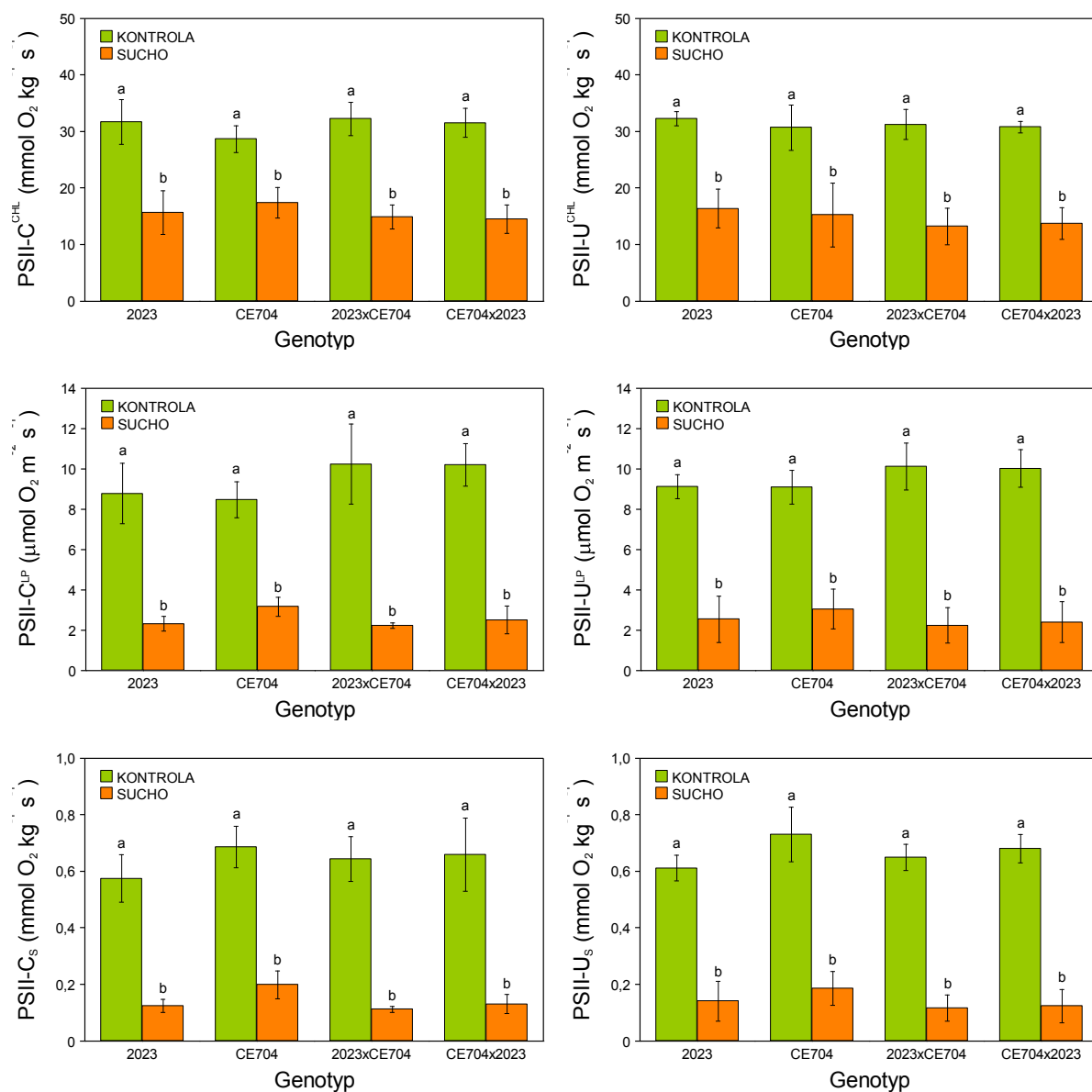
Při spektrofotometrickém stanovení obsahu fotosyntetických pigmentů jsem vyšší obsah Chl *a* a částečně i Chl *b*, stejně jako vyšší obsah Kar, pozorovala u kontrolních rostlin obou F1 kříženců ve srovnání s rodičovskými liniemi (**Obr. 26**). Sucho vedlo u všech genotypů k poklesu hodnot těchto charakteristik, který byl výraznější při jejich vyjádření v přepočtu na jednotku hmotnosti sušiny listu (to bylo zřetelné zejména u obsahu Chl *b* a Kar). Jednotlivé genotypy se ve stresových podmínkách mezi sebou nelišily (**Obr. 26**). Uvedené změny se odrazily i ve změnách poměrů fotosyntetických pigmentů – hodnoty poměru Chl *a/b* v důsledku sucha statisticky průkazně klesly u všech čtyř hodnocených genotypů s výjimkou linie 2023 (která v kontrolních podmínkách vykazovala nejnižší poměr Chl *a/b* v listech). Statisticky průkazný pokles jsem pozorovala i pro poměr celkového Chl a Kar; tento pokles byl nejvýraznější u rodičovské linie CE704 (**Obr. 26**).

Aktivita PSII měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů se u všech genotypů vlivem stresu suchem statisticky významně snížila, a to bez ohledu na to, zda byl elektronový transport spřažen s fotofosforylací nebo odpřažen od fotofosforylace, a rovněž i bez ohledu na způsob vyjádření této charakteristiky (v přepočtu na jednotku plochy listu, jednotku hmotnosti sušiny listu nebo jednotkové množství Chl v chloroplastových suspenzích). Jednotlivé genotypy se však mezi sebou statisticky významně nelišily, a to ani v kontrolních, ani ve stresových podmínkách (**Obr. 27**). Podobně tomu bylo i u aktivity PSI, kde ovšem hodnoty této charakteristiky při vyjádření na jednotkové množství Chl v důsledku sucha klesaly menší měrou v porovnání s aktivitou PSII (**Obr. 28**). V případě aktivity WETC jsem nenalezla statisticky průkazné rozdíly ani mezi kontrolními a stresovanými rostlinami, ani mezi jednotlivými genotypy v rámci jednoho způsobu pěstování (výsledky nejsou uvedeny).

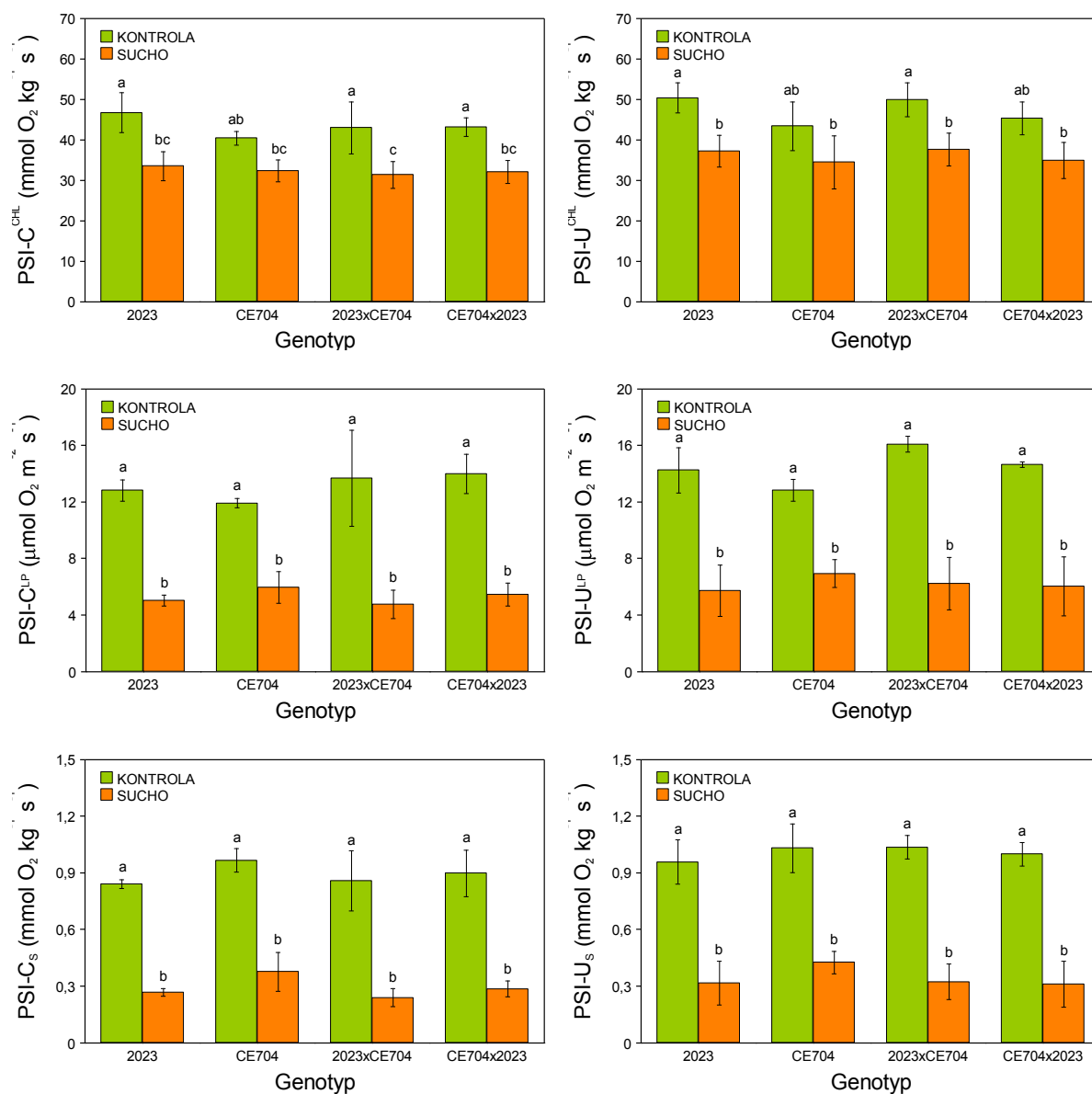
Obr. 26. Obsahy a poměry fotosyntetických pigmentů vyjádřené v přepočtech na jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) (Chl ... chlorofyl, Kar ... celkové karotenoidy) **u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023)** pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) **po dobu 10 dnů od začátku stresové periody**. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 20). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



Obr. 27. Aktivita fotosystému II měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů ve sprážení (PSII_C) nebo odpřažení (PSII_U) od fotosforylace a vyjádřená v přepočtech na jednotkové množství chlorofylu (CHL), jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty ± SD (n = 4). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



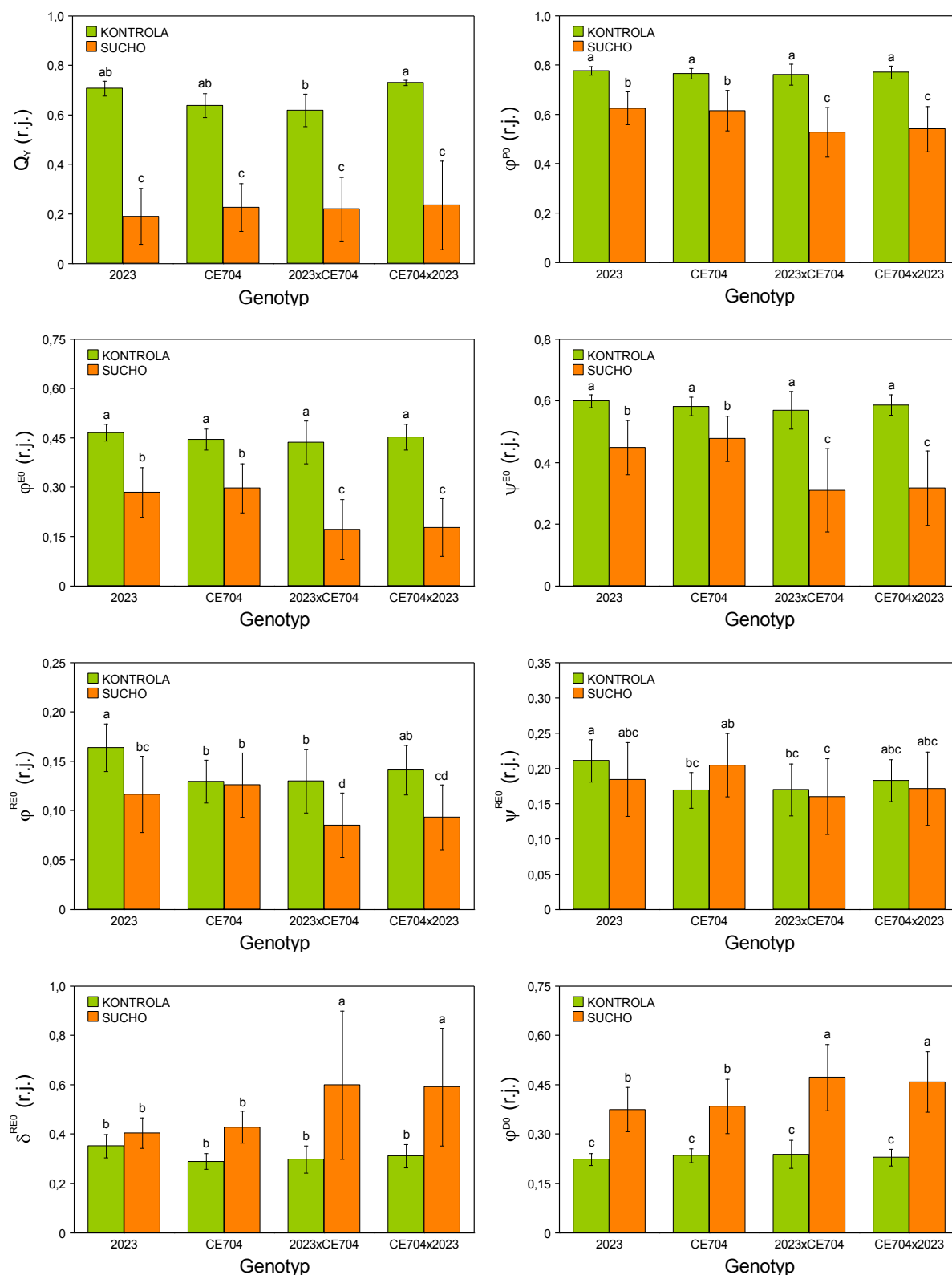
Obr. 28. Aktivita fotosystému I měřená v suspenzích izolovaných chloroplastů ve sprážení (PSI_C) nebo odpřažení (PSI_U) od fotosyntetické a vyjádřená v přepočtech na jednotkové množství chlorofylu (CHL), jednotku plochy listu (LP) nebo jednotku sušiny listu (S) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 4$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$.



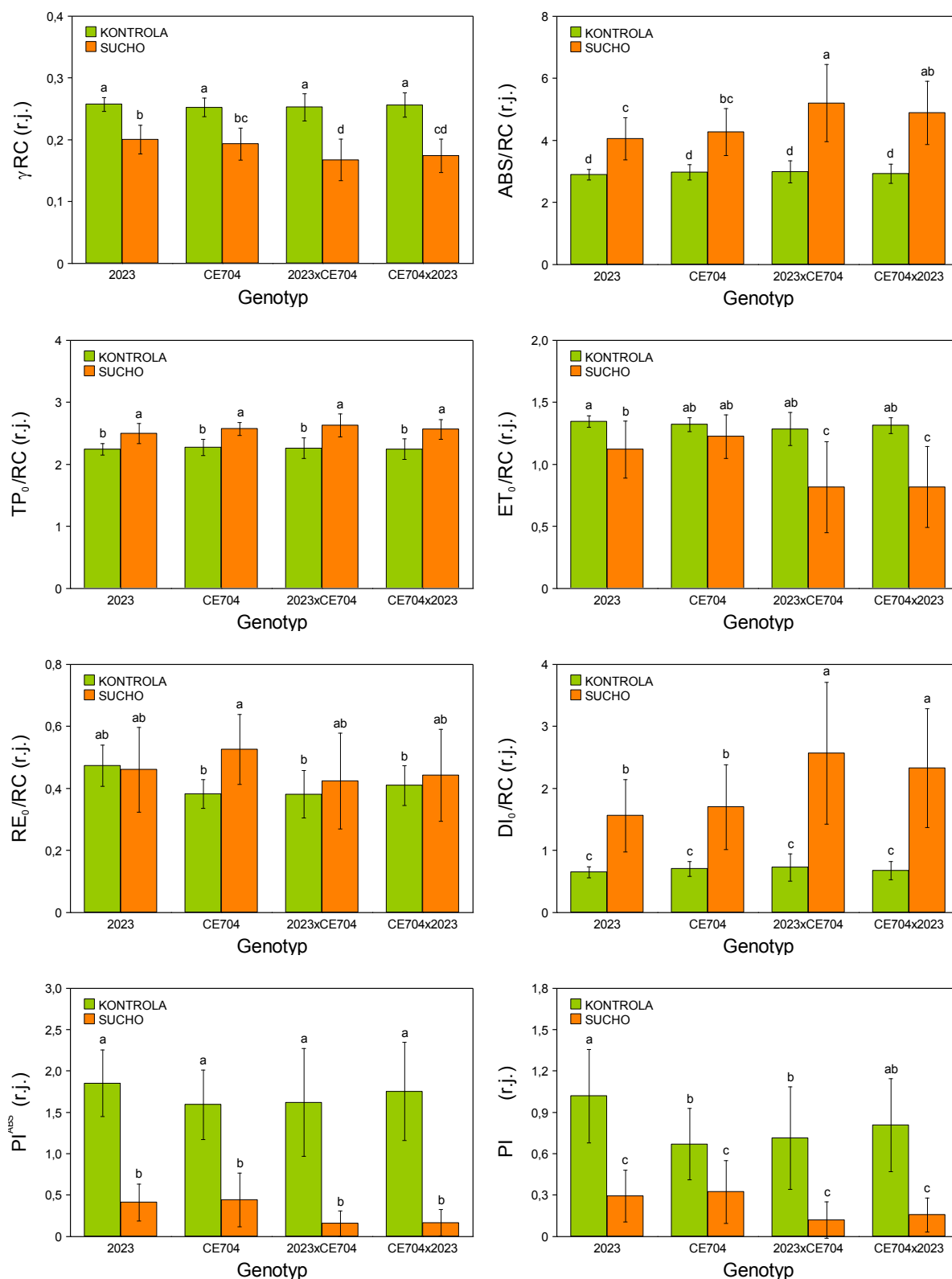
V parametru Q_Y měřeném na světelně adaptovaných listech nebyly v kontrolních podmínkách mezi genotypy statisticky průkazné rozdíly s výjimkou rozdílu mezi oběma F1 kříženci, kde genotyp CE704×2023 vykazoval vyšší hodnotu. Ve stresových podmínkách hodnoty tohoto parametru u všech genotypů významně klesly (**Obr. 29**). Účinnost primárních fotosyntetických procesů hodnocená na základě OJIP analýzy u temnotně adaptovaných listů se v kontrolních podmínkách mezi genotypy většinou také nelišila, a to zejména v případě parametrů spojených s přenosem elektronů v rámci RC PSII (parametry ϕ_{P0} , ϕ_{E0} , ψ_{E0} , ET_0/RC). U stresovaných rostlin byla účinnost snížena, větší měrou u kříženců v porovnání s oběma rodičovskými liniemi, a nejméně u linie CE704 (**Obr. 29, 30**). Dalším parametrem JIP testu, který byl negativně ovlivněn dehydratací, byl γRC , jehož hodnoty se snížily u všech genotypů, zejména u kříženců (**Obr. 30**). Výrazně u všech genotypů poklesly v důsledku sucha i hodnoty performančních indexů PI_{ABS} i PI_{TOTAL} , přičemž o něco menší snížení hodnot vykazovala opět linie CE704 (**Obr. 30**). Linie 2023 v kontrolních podmínkách vykazovala vyšší hodnoty parametrů popisujících procesy spojené s přenosem elektronů až na koncové akceptory PSI (ϕ_{RE0} , ψ_{RE0} , δ_{RE0} , RE_0/RC), i když ne vždy byl tento rozdíl statisticky průkazný (**Obr. 29, 30**). Ve stresových podmínkách hodnoty parametru ϕ_{RE0} významně klesly s výjimkou genotypu CE704, kde zůstaly na úrovni kontroly. Změny parametrů ψ_{RE0} , δ_{RE0} a RE_0/RC ve stresu nebyly většinou statisticky průkazné s výjimkou nárůstu δ_{RE0} u obou kříženců a zvýšení RE_0/RC u genotypu CE704 (**Obr. 29, 30**). Co se týče JIP parametrů souvisejících se zachycením fotonů/excitonů (ABS/RC , TP_0/RC), v kontrolních podmínkách se mezi sebou genotypy nelišily a v důsledku sucha došlo ke zvýšení hodnot těchto parametrů, které bylo v případě ABS/RC výraznější u kříženců (**Obr. 30**). Stejný trend byl pozorován i u parametrů DI_0/RC a ϕ_{D0} , reprezentujících disipaci přebytečné energie (**Obr. 29, 30**).

Rozbor OJIP křivek relativní variabilní fluorescence a diferenční kinetiky opět ukázal několik zajímavých rozdílů mezi genotypy i mezi ošetřeními. Již na průběhu celé OJIP křivky bylo možné vidět rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami i mezi genotypy – nejmenší vliv mělo sucho na rodičovskou linii CE704 (**Obr. 31**). U časové závislosti relativní variabilní fluorescence W_{IP} byl u stresovaných rostlin všech genotypů (zejména však u F1 kříženců) patrný posun doprava, signalizující snížení rychlosti fotosyntetického elektronového transportu až ke koncovým akceptorům PSI (**Obr. 31**). Také velikost hotovosti (poolu) PSI akceptorů W_{OI} v důsledku sucha zřejmě u obou kříženců a také mírně u linie 2023 klesla, jak bylo patrné z posunu křivek W_{OI} dolů, naopak u linie CE704 zůstala zhruba na úrovni kontrolních rostlin. Linie 2023 přitom měla jak v kontrolních, tak ve stresových podmínkách pěstování největší hotovost těchto akceptorů a kříženec 2023×CE704 nejmenší (**Obr. 31**). K-pás zvýrazněný pomocí křivky diferenční kinetiky ΔW_{OJ} a reprezentující funkční stav OEC, případně relativní velikost LHCI, byl u stresovaných rostlin všech genotypů v „pozitivní“ části grafu, což je typické pro inaktivaci OEC a/nebo zvětšení světlosběrné antény PSII. Výraznější změny oproti kontrole byly v porovnání s rodiči u obou kříženců (**Obr. 31**). Také L-pás zřejmý na křivkách diferenční kinetiky ΔW_{OK} se nacházel v „pozitivní“ části grafu, což vypovídá o zhoršené energetické konektivě mezi jednotlivými PSII komplexy u rostlin stresovaných suchem. V tomto případě byl výraznější negativní efekt nedostatku vody u genotypů CE704 a 2023×CE704 ve srovnání s 2023 a CE704×2023, které na stres reagovaly v tomto ohledu méně citlivě (**Obr. 31**).

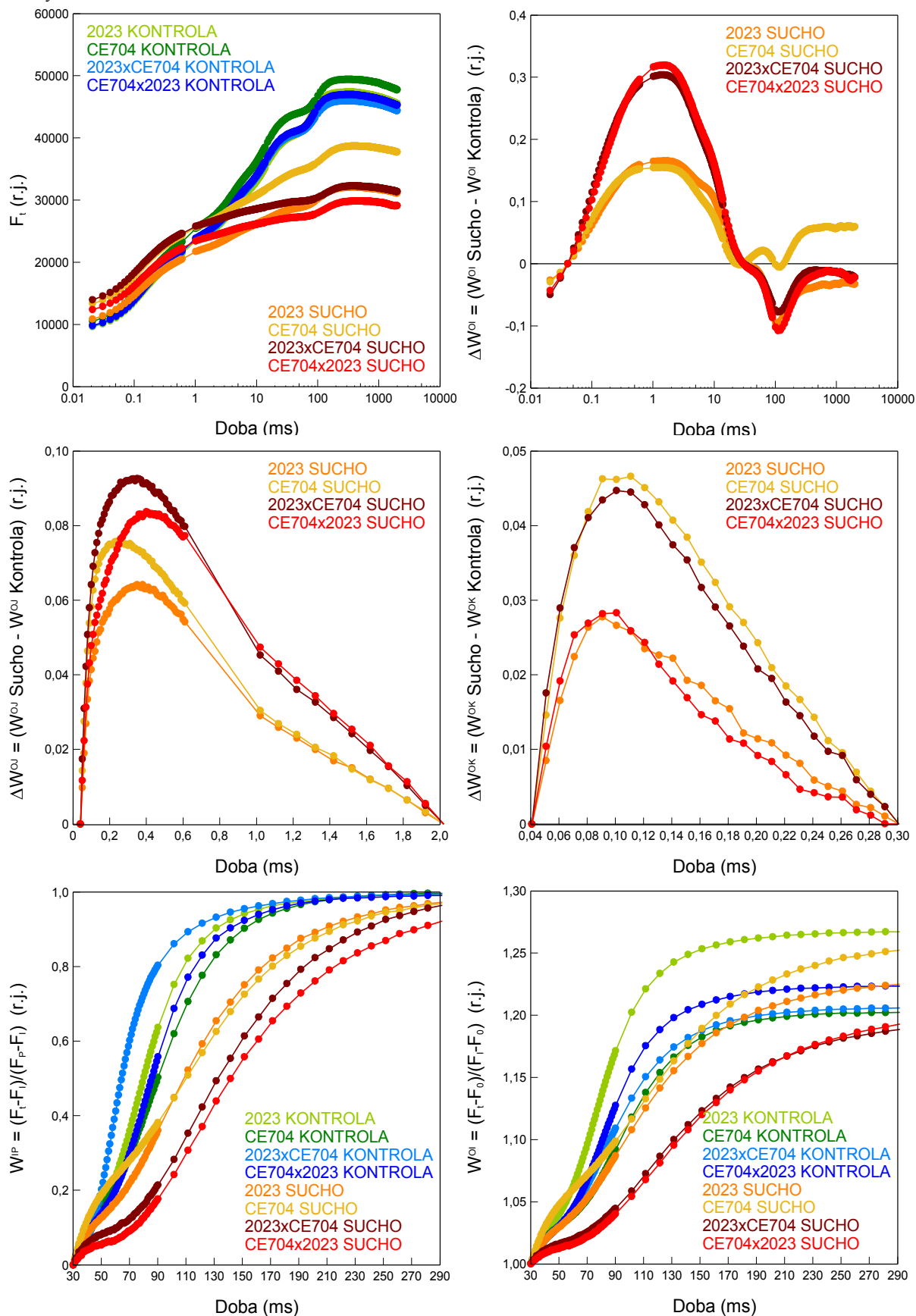
Obr. 29. Maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u listů ve světelně adaptovaném stavu (Q_Y) a další charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu (ϕ_{P0} ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, ϕ_{E0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B , ψ_{E0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B , ϕ_{RE0} ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, ψ_{RE0} ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, δ_{RE0} ... účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, ϕ_{D0} ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. r.j. ... relativní jednotky.



Obr. 30. Vybrané charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu (γ RC ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, ABS/RC ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, TP_0 /RC ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, ET_0 /RC ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, RE_0 /RC ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, DI_0 /RC ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, PI_{ABS} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukcí Q_B , PI_{TOTAL} ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukcí koncových akceptorů PSI) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD (n = 20). Písmena nad sloupci značí statistickou průkaznost rozdílů mezi jednotlivými variantami (genotyp/pěstování); pouze hodnoty označené odlišnými písmeny se statisticky průkazně liší při $p \leq 0,05$. r.j. ... relativní jednotky.



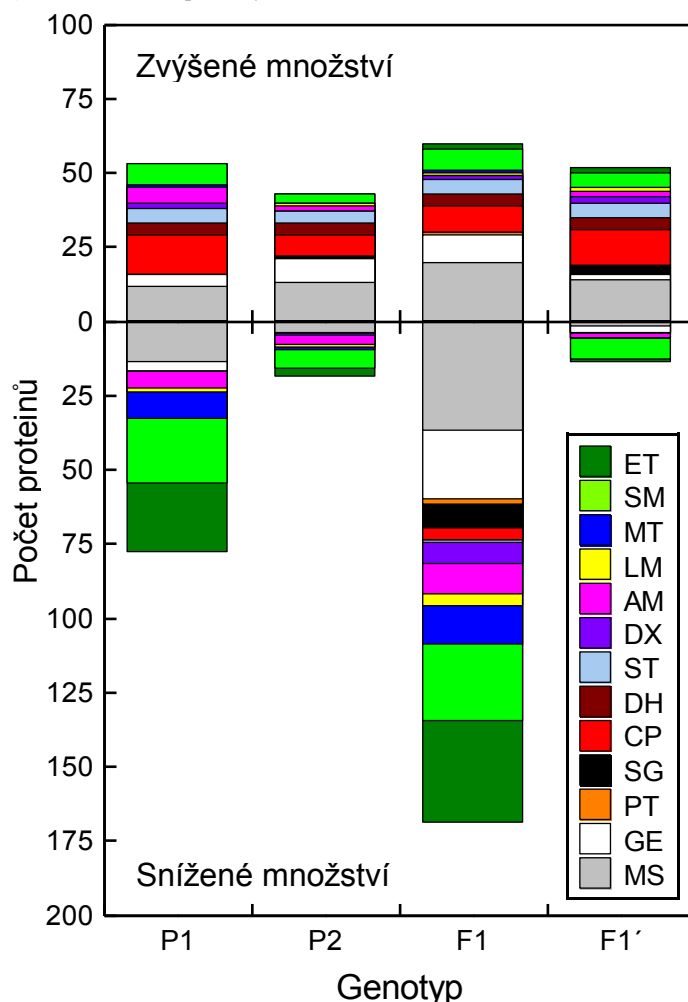
Obr. 31. Časová závislost (OJIP křivka) fluorescence chlorofylu (F_t), křivky diferenční kinetiky v oblasti mezi inflexními body O a I (ΔW_{OI}), O a J (ΔW_{OJ}), O a K (ΔW_{OK}), relativní variabilní fluorescence chlorofylu mezi body I a P s maximální amplitudou fixovanou jako 1 (W_{IP}) a část křivky relativní variabilní fluorescence chlorofylu mezi body O a I s hodnotami vyššími než 1 (W_{OI}) u dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) a jejich kříženců F1 generace (2023×CE704, CE704×2023) pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho) po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou průměrné hodnoty \pm SD ($n = 20$). r.j. ... relativní jednotky.



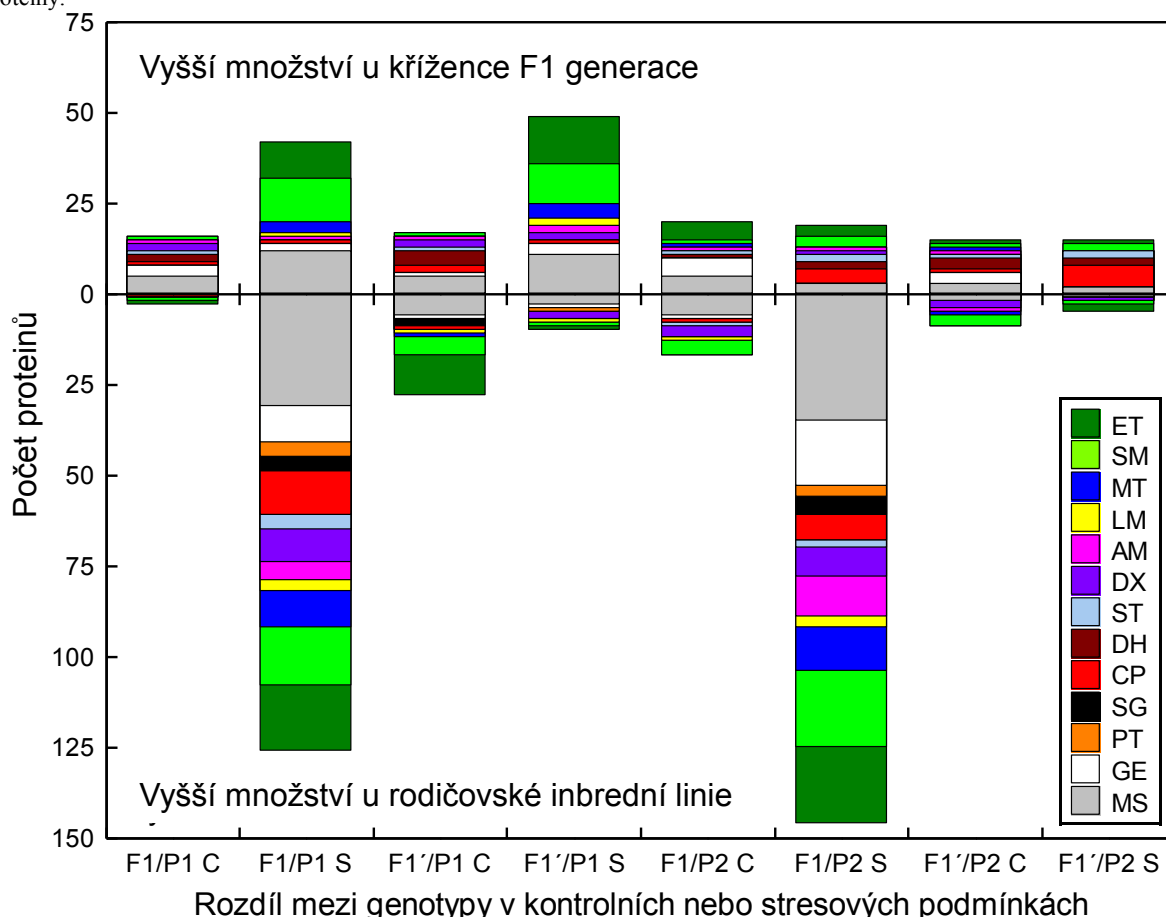
Analýzou listového proteomu prostřednictvím iTRAQ a prohledáváním NCBI databáze jsem identifikovala 857 proteinů. Z tohoto počtu vykazovalo 297 proteinů minimálně dvojnásobnou změnu v důsledku stresu suchem alespoň u jednoho genotypu. Tyto proteiny byly rozřazeny do 13 skupin na základě jejich funkce (**Obr. 32, Příloha 3**). Vedle proteinů s různými nebo neznámými funkcemi (21,2 %) byly nejzastoupenější skupinou proteiny primárních fotosyntetických procesů (17,2 %), proteiny metabolismu sacharidů (15,8 %) a proteiny podílející se na genové expresi a její regulaci (14,1%) (**Příloha 3**). Co se týče rozdílů mezi F1 kříženci a jejich inbredními rodičovskými liniemi, z celkového počtu 857 proteinů identifikovaných analýzou iTRAQ a nalezených v NCBI databázi vykazovalo 268 proteinů přinejmenším dvojnásobný rozdíl mezi alespoň jedním křížencem a jeho jedním rodičem buď u kontrolních nebo u stresovaných rostlin (nebo u obou). Funkční rozdělení těchto proteinů ukázalo, že proteiny s různou/neznámou funkcí (21,3 %), proteiny spojené s primárními fotosyntetickými procesy (18,0 %), proteiny účastníci se metabolismu sacharidů (15,4 %) a proteiny podílející se na genové expresi a její regulaci (12,7 %) byly opět nejhojněji zastoupenými skupinami (**Obr. 33, Příloha 3**).

V kontrolních podmínkách nebyly rozdíly mezi kříženci a rodiči příliš výrazné (**Obr. 33**). F1 kříženec CE704×2023 a jeho rodičovská linie 2023 se lišily největším počtem proteinů (45), následoval kříženec 2023×CE704 vs inbrední linie CE704 (38 proteinů s alespoň dvojnásobným rozdílem v hladinách). Tyto proteiny patřily do různých funkčních skupin a nedal se zde pozorovat žádný obecnější trend. V obsahu dehydrinů se však rodiče a kříženci lišili právě pouze u kontrolních rostlin (**Obr. 33, Příloha 3**).

Obr. 32. Funkční klasifikace proteinů, u nichž byly iTRAQ analýzou listového proteomu nalezeny u rostlin inbredních linií kukuřice 2023 (P1) a CE704 (P2) a jejich kříženců F1 generace 2023×CE704 (F1) a CE704×2023 (F1') změny v důsledku vystavení vodnímu deficitu po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Uvedeny jsou počty proteinů v jednotlivých kategoriích, které vykazovaly zvýšené nebo snížené množství v důsledku sucha, přičemž započítány byly pouze proteiny, v nichž byl iTRAQ poměr $\geq 2,0$. AM ... proteiny účastníci se metabolismu aminokyselin, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce a syntézy chlorofylu, CP ... chaperony, DH ... dehydriny, DX ... detoxifikační proteiny, GE ... proteiny účastníci se regulace genové exprese, LM ... proteiny účastníci se metabolismu lipidů, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastníci se transportu různých látek, PT ... proteázy a jejich inhibitory, SG ... proteiny účastníci se buněčné signalizace, SM ... proteiny účastníci se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂), ST ... stresové proteiny.



Obr. 33. Funkční klasifikace proteinů, u nichž byly iTRAQ analýzou listového proteomu u rostlin inbredních linií kukuřice 2023 (P1) a CE704 (P2) a jejich kříženců F1 generace 2023×CE704 (F1) a CE704×2023 (F1') nalezeny rozdíly mezi jednotlivými genotypy u rostlin pěstovaných v podmínkách dostatku vody (C) nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 10 dnů od začátku stresové periody (S). Uvedeny jsou počty proteinů v jednotlivých kategoriích, které vykazovaly rozdíl v množství při porovnání příslušné dvojice genotypů, přičemž započítány byly pouze proteiny, v nichž byl buď iTRAQ poměr $\geq 2,0$. AM ... proteiny účastníci se metabolismu aminokyselin, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce a syntézy chlorofylu, CP ... chaperony, DH ... dehydriny, DX ... detoxifikační proteiny, GE ... proteiny účastníci se regulace genové exprese, LM ... proteiny účastníci se metabolismu lipidů, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastníci se transportu různých látek, PT ... proteázy a jejich inhibitory, SG ... proteiny účastníci se buněčné signalizace, SM ... proteiny účastníci se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂), ST ... stresové proteiny.



Počet proteinů, které byly suchem indukovány, byl celkem podobný u všech genotypů (43-60 proteinů s alespoň dvojnásobnou změnou hladiny vlivem sucha). Tyto proteiny byly reprezentovány především chaperony, dehydriny, stresovými proteiny nebo (hlavně u genotypů CE704 a 2023×CE704) proteiny majícími roli v regulaci genové exprese (**Obr. 32**). Téměř všechny proteiny s výrazně vysokou akumulací během dehydratace patřily právě do skupiny dehydrinů nebo chaperonů (pouze u F1 křížence 2023×CE704 jsem zaznamenala u některých chloroplastových chaperonů pokles množství v důsledku sucha), jak je patrné i z **Tab. 34**, která ukazuje nejextrémnější odpovědi na stres suchem (**Tab. 34, Příloha 3**). Největší zvýšení hladin proteinů u rostlin vystavených nedostatku vody jsem pozorovala u inbrední linie 2023 (téměř 32-násobný nárůst množství pro některé dehydriny), kdežto linie CE704 vykazovala nejnižší úroveň nárůstu hladiny proteinů mezi všemi genotypy. U všech genotypů s výjimkou linie CE704 byl v důsledku dehydratace poměrně intenzívně indukován také stresový protein „ABA/water deficit stress-induced protein“ (**Příloha 3**). U všech genotypů došlo rovněž ke zvýšení obsahu xyloglukanendotransglykosylázy a pozorovala jsem i nárůst hladin dvou izoformů sacharózasyntázy, přičemž nejvíce jejich obsah narostl u rodičovské linie 2023 (**Příloha 3**).

Více rozdílů mezi genotypy v jejich odpovědi na sucho jsem pozorovala u proteinů, jejichž hladina byla suchem snížena. Inbrední linie CE704 a kříženec CE704×2023 byly charakterizovány pouze malým množstvím těchto proteinů (20, resp. 15), ostatní dva genotypy (zejména kříženec 2023×CE704 s téměř 170 proteiny, jejichž hladina se při stresu snížila) vykazovaly výrazný pokles množství proteinů v důsledku sucha (**Obr. 32, Příloha 3**). To mělo za následek zvýraznění rozdílů

mezi inbredními liniemi a tímto F1 křížencem ve stresových podmínkách (genotyp 2023×CE704 měl nižší hladinu 136 proteinů oproti rodičovské linii 2023, a 146 proteinů oproti rodičovské linii CE704) (**Obr. 33, Příloha 3**). U křížence 2023×CE704 jsem našla vůbec nejvyšší úroveň snížení hladiny proteinů v důsledku sucha, kde obsah ribozomálního proteinu S4 vykazoval téměř 43-násobný pokles a dvě podjednotky PSII (PsbA/D1 protein RC a PsbE/cytochrom *b₅₅₉* podjednotka PSII) vykazovaly 25-30-násobný pokles hladiny ve srovnání s kontrolními rostlinami (**Tab. 34**). Genotypy CE704 a CE704×2023 byly charakterizovány pouze mírným poklesem hladiny proteinů (maximálně 2-3-násobným oproti kontrole) (**Tab. 34, Příloha 3**). Kříženec CE704×2023 se od rodičovské linie CE704 ve stresových podmínkách téměř nelišil (bylo nalezeno pouze 20 proteinů s alespoň dvojnásobným rozdílem hladin, 6 z nich přitom patřilo o skupiny chaperonů), avšak vykazoval vyšší hladinu u téměř 50 proteinů (zejména fotosyntetických) ve srovnání s rodičovskou linií 2023 (**Obr. 33, Příloha 3**).

Proteiny, jejichž množství se v důsledku sucha snížilo, patřily především do kategorií fotosyntetického elektron-transportního řetězce a fixace uhlíku (podrobněji popsáno dále) nebo jiných částí metabolismu sacharidů (**Obr. 32**). Sníženo bylo např. množství některých enzymů účastnících se syntézy škrobu, zejména u linie 2023 a křížence 2023×CE704. U tohoto křížence došlo také ke výraznějšímu poklesu obsahu některých enzymů glykolýzy a Krebsova cyklu (např. fruktózbisfosfátaldolázy, pyruvátkinázy či malátdehydrogenázy). U všech pozorovaných genotypů se snížila i hladina jedné izofomy fosfoenolpyruvátcarboxykinázy (**Příloha 3**). Především u křížence 2023×CE704 došlo v důsledku stresu k poměrně výraznému snížení množství mnoha proteinů účastnících se genové exprese a její regulace, především ribozomálních proteinů (zejména chloroplastových, ale i cytosolických), histonu H4 (naopak v případě histonů H2A a H2B se jejich obsah u tohoto křížence v důsledku sucha zvýšil) a některých dalších (**Příloha 3**). U linie CE704 v této skupině proteinů nedošlo k žádnému poklesu, naopak se zvýšil obsah několika cytosolických ribozomálních proteinů (**Příloha 3**). Genotypy 2023 a 2023×CE704 vykazovaly také pokles hladin poměrně velkého množství membránových transportních proteinů a proteinů účastnících se metabolismu aminokyselin (**Obr. 32, Příloha 3**). U genotypu 2023×CE704 jsem významný pokles v důsledku sucha (a následný rozdíl oproti rodičovským liniím) zaznamenala i u detoxifikačních proteinů (např. několik izoform GST nebo POX) a proteinů účastnících se buněčné signalizace (např. jedna Ser/Thr-proteinkináza nebo Rab7 protein z Ras rodiny monomerních G proteinů) (**Obr. 32, 33, Příloha 3**).

Tab. 34. Deset proteinů, u nichž byly iTRAQ analýzou listového proteomu u inbredních linií kukuřice 2023 (P1) a CE704 (P2) a jejich kříženců F1 generace 2023×CE704 (F1) a CE704×2023 (F1') nalezeny nejvýraznější rozdíly mezi rostlinami pěstovanými v podmínkách dostatku vody nebo vystavenými vodnímu deficitu po dobu 10 dnů od začátku stresové periody (pět proteinů, u nichž došlo ke zvýšení množství, pět proteinů, u nichž došlo ke snížení množství v důsledku sucha; seřazeno podle příslušného genotypu). Čísla ve sloupcích "P1", "P2", "F1" a "F1'" představují vždy konkrétní rozdíl mezi stresovanými (S) a kontrolními (C) rostlinami (poměr iTRAQ vyjádřený jako poměr S/C; pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila, byl použit poměr -1/(S/C)). Uvedena je sekvence, podle níž byl protein identifikován (BD ... identifikováno na základě homologní sekvence u *Brachypodium distachyon* L., jinak vždy podle databáze *Zea mays* L.). CP ... chaperony, DH ... dehydriny, DX ... detoxifikační proteiny, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastnící se transportu různých látek, PT ... proteázy a jejich inhibitory, SM ... proteiny účastnící se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂).

| Protein | P1 | P2 | F1 | F1' | Sekvence (EST/protein) | Funkční kategorie |
|---------------------------------------|-------|------|------|------|------------------------|-------------------|
| Seřazeno podle inbrední linie 2023 | | | | | | |
| Dehydrin | 31,9 | 9,0 | 20,7 | 9,5 | gi 195625830 | DH |
| Dehydrin | 29,4 | 11,2 | 18,9 | 12,7 | gi 223950115 | DH |
| Dehydrin | 24,4 | 9,0 | 11,7 | 7,2 | gi 532623 | DH |
| LEA protein | 17,1 | 6,4 | 14,1 | 17,1 | gi 7387829 | DH |
| Hypotetický protein | 15,0 | 1,6 | 4,1 | 4,1 | gi 195655323 | MS |
| Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza B | -18,3 | -1,6 | -5,8 | -2,9 | gi 238011684 | SM |
| CP12-1 protein | -18,1 | -2,4 | -1,3 | -3,6 | gi 226493683 | SM |
| PsbH podjednotka PSII | -16,6 | -2,6 | -4,7 | -3,2 | gi 902250 | ET |
| Pyruvát,orthofosfátdehydrogenáza | -16,0 | -2,3 | -4,8 | -2,2 | gi 257659143 | SM |
| β podjednotka ATPázy | -9,6 | -1,5 | -8,0 | -1,5 | gi 902229 | MT |

Tab. 34. – pokračování

| Protein | P1 | P2 | F1 | F1' | Sekvence (EST/protein) | Funkční kategorie |
|--|-------|------|-------|------|----------------------------|-------------------|
| Seřazeno podle inbrední linie CE704 | | | | | | |
| Dehydrin | 29,4 | 11,2 | 18,9 | 12,7 | gi 223950115 | DH |
| Dehydrin | 11,3 | 9,5 | 13,7 | 4,7 | gi 226532838 | DH |
| Dehydrin | 24,4 | 9,0 | 11,7 | 7,2 | gi 532623 | DH |
| Dehydrin | 31,9 | 9,0 | 20,7 | 9,5 | gi 195625830 | DH |
| Protein-vazebný protein | 1,3 | 6,8 | -1,6 | 2,8 | gi 238011090 | MS |
| Fosfoenolpyruvátkarboxykináza | -4,2 | -3,3 | -3,8 | -3,4 | gi 291048562 | SM |
| UDP-sulfochinovózsyntáza | -1,8 | -2,8 | -2,2 | 1,1 | gi 238014584 | MS |
| Kataláza | 2,2 | -2,7 | 1,6 | 1,5 | gi 257675731 | DX |
| RbcS (malá podjednotka Rubisco) | -3,8 | -2,6 | -3,1 | -2,1 | gi 313574198 | MS |
| Cytochrom <i>b₆</i> | -2,3 | -2,6 | -4,5 | -1,5 | gi 902251 | ET |
| Seřazeno podle F1 křížence 2023×CE704 | | | | | | |
| Dehydrin | 31,9 | 9,0 | 20,7 | 9,5 | gi 195625830 | DH |
| Dehydrin | 29,4 | 11,2 | 18,9 | 12,7 | gi 223950115 | DH |
| LEA protein | 17,1 | 6,4 | 14,1 | 17,1 | gi 7387829 | DH |
| Dehydrin | 11,3 | 9,5 | 13,7 | 4,7 | gi 226532838 | DH |
| Heat shock protein (HSP70) | 8,2 | 5,8 | 13,2 | 6,2 | gi 308081377 ^{BD} | CP |
| Ribozomální protein S4 | -1,1 | 1,3 | -42,9 | -1,3 | gi 902224 | GE |
| PsbE (cytochrom <i>b₅₅₉</i> α) podjednotka PSII | -2,3 | -1,7 | -29,9 | -1,4 | gi 902238 | ET |
| PsbA (D1 protein reakčního centra) podjednotka PSII | -2,0 | -1,2 | -25,8 | -1,5 | gi 902201 | ET |
| Chloroplastový přenašeč triózfosfátů/fosfátů | -1,2 | 1,9 | -12,8 | 1,2 | gi 126633328 | MT |
| ATP-dependentní proteolytická podjednotka Clp proteázy | -1,7 | -1,5 | -12,7 | -1,4 | gi 226529931 | PT |
| Seřazeno podle F1 křížence CE704×2023 | | | | | | |
| LEA protein | 17,1 | 6,4 | 14,1 | 17,1 | gi 7387829 | DH |
| Dehydrin | 29,4 | 11,2 | 18,9 | 12,7 | gi 223950115 | DH |
| Malý heat shock protein | 10,2 | 4,5 | 13,1 | 11,4 | gi 296512733 | CP |
| Dehydrin | 31,9 | 9,0 | 20,7 | 9,5 | gi 195625830 | DH |
| Dehydrin | 24,4 | 9,0 | 11,7 | 7,2 | gi 532623 | DH |
| CP12-1 protein | -18,2 | -2,4 | -1,3 | -3,6 | gi 226493683 | SM |
| Fosfoenolpyruvátkarboxykináza | -4,2 | -3,3 | -3,8 | -3,4 | gi 291048562 | SM |
| PsbH podjednotka PSII | -16,6 | -2,6 | -4,7 | -3,2 | gi 902250 | ET |
| Enzym biosyntézy thiaminu | -4,7 | -2,1 | -10,1 | -3,1 | gi 596080 | MS |
| Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza B | -18,3 | -1,6 | -5,8 | -2,9 | gi 238011684 | SM |

Většina proteinů, u nichž došlo v případě inbrední linie 2023 a F1 křížence 2023×CE704 u rostlin vystavených nedostatku vody k poklesu množství, však patřila do skupiny proteinů fotosyntetického elektron-transportního řetězce nebo proteinů podílejících se na fotosyntetické fixaci uhlíku. Při podrobnějším rozboru změn v obsahu fotosyntetických proteinů jsem zjistila, že (až na několik výjimek) nebyly u rostlin pěstovaných v kontrolních podmínkách v tomto aspektu rozdíly mezi genotypy (Tab. 35, Příloha 3). Zajímavým případem však byly LHC proteiny, jejichž hladina byla u křížence CE704×2023 významně nižší ve srovnání s rodičovskou linií 2023 a zejména s reciprokým křížencem 2023×CE704. Obdobný rozdíl byl pozorován i u některých podjednotek ATP-syntázy, některých menších podjednotek PSI nebo u jedné izoformy PetB proteinu – součásti komplexu cytochrom *b₆f* (Tab. 35). Množství jedné izoformy Psal podjednotky PSI bylo výrazně nižší u linie CE704 ve srovnání jak s linií 2023, tak s křížencem 2023×CE704 (Tab. 35). Obsah enzymů Calvinova cyklu byl v kontrolních podmínkách mezi genotypy vyrovnaný, s výjimkou dvou proteinů ovlivňujících funkci Rubisco: α podjednotky RSBP, která byla nejhojněji zastoupená u genotypu 2023 ve srovnání s ostatními genotypy, a RCA, která byla u genotypu CE704 přítomna v menší míře než u 2023 a CE704×2023. Dále je nutno zmínit PEPC, protein C4 cyklu, jejíž hladina byla vyšší u genotypů 2023 a 2023×CE704 (Tab. 35).

Jediným fotosyntetickým proteinem, u něhož jsem v důsledku sucha pozorovala výrazný nárůst množství bez ohledu na analyzovaný genotyp, byla RCA. K mírnému nárůstu množství dále došlo u dvou LHC proteinů v případě křížence CE704×2023, a dále PsaE podjednotky PSI a proteinu, který je zřejmě součástí NAD(P)H dehydrogenázy (NDH) a může se podílet na CET kolem PSI (**Tab. 35**). Stres suchem však vyvolal pokles obsahu řady fotosyntetických proteinů především u genotypů 2023 a 2023×CE704. Týkalo se to některých proteinů syntézy/přeměny fotosyntetických pigmentů, dále LHC proteinů (což mělo za následek vyrovnání rozdílů mezi genotypy patrných v kontrolních podmínkách, případně u tří LHC proteinů obsah u 2023×CE704 klesl natolik, že byl nižší než u obou rodičovských linií) (**Tab. 35**). Jeden z nejvýraznějších poklesů množství nastal v důsledku dehydratace u linie 2023, ale zejména u 2023×CE704, v případě proteinů PSII (oba hlavní proteiny RC – PsbA/D1 i PsbD/D2, dále PsbE a PsbH, ale i oba proteiny vnitřní světlosběrné antény PSII nebo některé proteiny OEC). V důsledku toho byla hladina těchto proteinů u křížence CE704×2023 a rodičovské linie CE704 výrazně vyšší než u rodičovské linie 2023 a ještě větší měrou než u druhého F1 křížence. Rozdíly mezi stresovanými rostlinami genotypů 2023 a 2023×CE704 nebyly u této skupiny proteinů jednoznačné, např. obsah PsbA/D1 proteinu a PsbE byl výrazně vyšší u linie 2023 a naopak protein PsbO byl hojnější u 2023×CE704 (**Tab. 35**). U některých proteinů cytochromového komplexu a PSI jsem během stresu suchem zaznamenala podobný trend jako u proteinů PSII, stejně tak u řady podjednotek ATP-syntázy a dále u ferredoxinů, ferredoxin-oxidoreduktáz, některých podjednotek NDH a některých dalších proteinů CET, u kterých za kontrolních podmínek nebyly mezi genotypy žádné rozdíly (**Tab. 35**).

Také u řady enzymů fotosyntetické fixace uhlíku došlo u stresovaných rostlin k poklesu jejich hladin. Největší počet proteinů se sníženou expresí a zároveň i nejvyšší relativní pokles množství vykazovala linie 2023 a za ní následoval kříženec 2023×CE704. Zvláště výrazné bylo toto snížení u A formy GAPDH, CP12 proteinu, který se účastní regulace Calvinova cyklu, a PPDK (**Tab. 35**). U linie CE704 a F1 křížence CE704×2023 mělo sucho na obsah proteinů účastnících se fotosyntetické fixace uhlíku minimální vliv a v důsledku toho byly hladiny mnoha těchto enzymů ve stresovaných rostlinách linie CE704 a křížence CE704×2023 vyšší v porovnání s druhými dvěma genotypy (**Tab. 35**). Rozdíly mezi 2023 a 2023×CE704 byly spíše ve prospěch 2023, oproti tomu rozdíly mezi CE704 a křížencem CE704×2023 nebyly téměř žádné (**Tab. 35**).

Tab. 35. Schematické znázornění rozdílů v množství fotosyntetických proteinů, nalezených iTRAQ analýzou listového proteomu u inbredních linií kukuřice 2023 (P1) a CE704 (P2) a jejich kříženců F1 generace 2023×CE704 (F1) a CE704×2023 (F1') v důsledku vystavení rostlin vodnímu deficitu po dobu 10 dnů od začátku stresové periody. Odpověď jednotlivých genotypů na stres suchem je vyjádřena jako poměr S/C , kde S představuje stresované rostliny a C představuje kontrolní rostliny; pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila, byl použit poměr $-1/(S/C)$. Pro srovnání odlišné reakce genotypů v rámci jednoho způsobu pěstování byly použity poměry $X1/X2$, kde $X1$ a $X2$ jsou srovnávané genotypy; pokud byla vyšší hladina proteinů u druhého genotypu, byly tyto poměry vyjádřeny jako $-1/(X1/X2)$. Vysvětlení barevné symboliky je uvedeno na konci tabulky. CET ... cyklický transport elektronů; OEC ... komplex vyvíjející kyslík, NDH ... NAD(P)H dehydrogenáza, Rubisco ... ribulózo-1,5-bisfosfátkarboxyláza/oxygenáza.

| Protein | S / C | | | | C | | | | | | | | S | | | | | | | |
|---|-------|----|----|-----|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|-------|--------|-------|-------|
| | P1 | P2 | F1 | F1' | P2/P1 | F1'/F1 | F1/P1 | F1/P2 | F1'/P1 | F1'/P2 | P2/P1 | F1'/F1 | F1/P1 | F1/P2 | F1'/P1 | F1'/P2 | P2/P1 | F1'/F1 | F1/P1 | F1/P2 |
| Syntéza / přeměna fotosyntetických pigmentů | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dehydratáza δ -aminolevulové kyseliny | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NADPH-protoklorofylidioxidoreduktáza | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Coproporphyrinogen-III-oxidáza | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Porfobilinogendeamináza | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Protoporphyrinogen-IX-oxidáza | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Violaxantindepoxidáza | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Komplexy světlosběrných antén | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lhcb4 (CP29 protein světlosběrné antény PSII) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lhcb5 (CP26 protein světlosběrné antény PSII) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lhcb6 (CP24 protein světlosběrné antény PSII) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lhcb6 (CP24 protein světlosběrné antény PSII) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bliže neurčený protein světlosběrné antény | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fotosystém II | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbA (D1 protein reakčního centra) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbB (CP47 protein vnitřní světlosběrné antény) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbC (CP43 protein vnitřní světlosběrné antény) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbD (D2 protein reakčního centra) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbE (cytochrom b_{559} α) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbO (33kDa protein OEC) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbO (33kDa protein OEC) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbP (23 kDa protein OEC) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbQ (16 kDa protein OEC) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbQ (16 kDa protein OEC) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbQ (16 kDa protein OEC) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsbS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cytochromový komplex | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PetB (cytochrom b_6) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PetB (cytochrom b_6) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PetC (Rieskeho protein) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fotosystém I | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaB | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaC | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaD | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaF | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaL | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PsaN | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ycf4 protein účastnící se sestavování fotosystému I | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tab. 35 – pokračování

| Protein | S / C | | | | Kontrola | | | | | | Sucho | | | | | |
|---|-------|----|----|----|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
| | P1 | P2 | F1 | F1 | P2 P1 | F1' F1 | F1 P1 | F1 P2 | F1' P1 | F1' P2 | P2 P1 | F1' F1 | F1 P1 | F1 P2 | F1' P1 | F1' P2 |
| Ferredoxin a oxidoreduktázy závislé na ferredoxinu | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PetF (ferredoxin) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PetF (ferredoxin) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zřejmě PetH (ferredoxin-NADP oxidoreduktáza) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ferredoxin-nitrit oxidoreduktáza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proteiny CET | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NdhH | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NdhI | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NdhK | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NdhM | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NdhN | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zřejmě podjednotka NDH komplexu | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zřejmě podjednotka NDH komplexu | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Protein účastnící se NADH-závislého CET | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Protein příbuzný Pgr5 proteinu účastnícího se CET | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ATP-syntáza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpA (α podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpA (α podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpB (β podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpB (β podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpB (β podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpC (γ podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpD (δ podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AtpE (ε podjednotka CF ₁) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Enzymy Calvinova cyklu (a jejich regulační proteiny) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RbcL (velká podjednotka Rubisco) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RbcL (velká podjednotka Rubisco) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RbcL (velká podjednotka Rubisco) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RbcS (malá podjednotka Rubisco) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| RbcS (malá podjednotka Rubisco) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aktiváza Rubisco | | | | | | | | | | | | | | | | |
| α podjednotka RSBP (chaperon Rubisco) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3-fosfoglycerátkináza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3-fosfoglycerátkináza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenáza, forma A | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3-fosfoglyceraldehyddehydrogenáza, forma B | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aldoláza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Aldoláza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fruktóza-1,6-bisfosfatáza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sedoheptulóza-1,7-bisfosfatáza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Transketoláza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ribulóza-5-fosfát-3-epimeráza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ribóza-5-fosfátizomeráza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CP12 protein (regulace Calvinova cyklu) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Enzymy C4 cyklu | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fosfoenolpyruvátcarboxyláza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NADP-malátdehydrogenáza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Jablečný enzym | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Pyruvát,fosfátdikináza | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Protein regulující pyruvát,fosfátdikinázu | | | | | | | | | | | | | | | | |

Rozdíl mezi jednotlivými experimentálními variantami je v rozmezí:

| | | | | | | | | | |
|-------|-----------|----------|---------|---------|--------|--------|---------|----------|------|
| ≤ -32 | (-32;-16) | (-16;-8) | (-8;-4) | (-4;-2) | (2; 4) | (4; 8) | (8; 16) | (16; 32) | ≥ 32 |
|-------|-----------|----------|---------|---------|--------|--------|---------|----------|------|

5. Diskuze

Cílem práce bylo zejména přispět k současným znalostem týkajících se mechanismů, jejichž prostřednictvím rostliny reagují na sníženou dostupnost vody, a genetické variability s tím spojené. V rámci toho jsem se pokusila odhalit možné příčiny odolnosti k suchu na základě detailního porovnání celkové reakce vybraných genotypů kukuřice s odlišnou tolerancí k dehydrataci, a to na fyziologické, morfologické i molekulárně-biologické (proteomické) úrovni. Zaměřila jsem se přitom především na fotosyntetické procesy. Dalším cílem bylo zjistit, zda je tato odolnost nějakým způsobem přenášena do dalších generací (což bylo umožněno začleněním kříženců F1 generace pocházejících z kontrastních rodičovských genotypů) a zda mohou být vybrané fotosyntetické parametry měřené u rodičů využity k predikci toho, jak se budou chovat jejich potomci. Analýza změn listového proteomu v důsledku sucha u kontrastních inbredních linií kukuřice a jejich F1 kříženců, zaměřená zejména na proteiny podílející se na fotosyntéze, která byla jednou z hlavních náplní mé práce, měla přispět ke komplexnějšímu pochopení reakce rostlin na tento stresový faktor a možných mechanismů odolnosti, a také k odhalení různých fotosyntetických strategií, kterými mohou jednotlivé genotypy suchu čelit.

Než jsem se pustila do detailního rozboru změn listového proteomu v důsledku sucha a jejich případných souvislostí se změnami různých fotosyntetických parametrů a parametrů souvisejících s růstem a vývojem rostlin, bylo ovšem potřeba zvolit vhodnou délku stresového období. Délka, resp. intenzita působení stresového faktoru, během které dojde buď k poškození rostliny nebo se naopak rostlina začne na stres aklimovat, je velice variabilní v závislosti na druhu rostliny i genotypu. Když jsem sledovala průběžnou reakci mladých rostlin kukuřice na postupné vysychání substrátu, pozorovala jsem, že v úplně počáteční fázi stresové periody byly hodnoty P_N u stresovaných rostlin průkazně vyšší než u kontrolních, a až při dalším prodloužení stresu se u stresovaných rostlin snížily. V případě g_s a E byl trend jiný: tyto charakteristiky se vyznačovaly spíše klesající tendencí již v brzké fázi stresové periody a s prodlužováním sucha pokles dále pokračoval. V počátečních stádiích sucha byl tedy vliv uzavřených průduchů na transpiraci větší než vliv na asimilaci CO_2 , avšak s dalším zvýšením vodního deficitu již byly výrazně utlumeny oba procesy. Časový bod 6 dnů sucha byl zřejmě jakýmsi přelomem, kdy v mladých rostlinách citlivých genotypů kukuřice docházelo k „přepnutí“ fotosyntetických procesů do „inhibičního módu“. S dalším prodloužením období sucha se stres začal již výrazněji projevovat na morfologii pokusných rostlin a řadě dalších fyziologických/biochemických charakteristik. Byl zde jasný vliv dehydratace na rychlost růstu a vývoje rostlin, což souviselo s celkovým potlačením fotosyntetických procesů, vedoucím ke snížení množství fotosyntetických asimilátů dostupných pro syntézu dalších substrátů nutných pro tvorbu biomasy (Lawlor *et al.* 2002, Chaves *et al.* 2004, Reddy *et al.* 2004).

Snížení fotosyntetické účinnosti je u rostlin uváděno jako obecný jev při působení stresu suchem. V mých pokusech jsem při sledování reakce různých inbredních i hybridních genotypů kukuřice na suchu po několika dnech zaznamenala pokles hodnot P_N u většiny studovaných genotypů, což bylo obvykle spojeno i s poklesem hodnot g_s a E . Nebyl to ale úplně obecný jev, a to ani v podmínkách silnějšího sucha nebo sucha v kombinaci se zvýšenou teplotou. Genotypy, u nichž nenastala změna v otevřenosti průduchů nebo se u nich dokonce hodnota g_s zvýšila ve srovnání s kontrolními rostlinami, se obvykle vyznačovaly také zvýšením E a P_N , a byla zde většinou také pozitivní korelace mezi E a P_N nebo mezi E a g_s . Uzavření průduchů, které vede ke snížení rychlosti/účinnosti transpirace a umožňuje rostlinám teoreticky lépe odolávat nedostatku vody v půdě, se často uvádí jako jeden z hlavních mechanismů reakce rostlin na nedostatek vody (Cattivelli *et al.* 2008, Farooq *et al.* 2009, Lopes *et al.* 2011). Nevýhodou ovšem může být omezení přístupu CO_2 a s tím spojené omezení účinnosti fotosyntetických procesů (Lopes *et al.* 2011, Tardieu 2012). Pro genotypy, u nichž v důsledku sucha dochází k poklesu g_s (a s tím spojené snížené účinnosti fotosyntetických procesů) by tak mohla být nevýhodná jejich snížená rychlost růstu a akumulace biomasy a možnost rychlého obnovení normálního metabolismu po skončení stresové periody. Naopak riskantnější strategie otevřených průduchů během vodního deficitu by mohla být výhodná při mírném suchu nebo tam, kde jsou periody sucha střídány pravidelně dešťovými srážkami, přičemž jsou rostliny schopny zachovat si relativně normální schopnost růstu. Ačkoliv je tedy nízká vodivost průduchů obvykle považována za obecnou odpověď na stres suchem a často uváděna jako znak spojený s odolností k suchu, pravděpodobně to platí zejména pro podmínky silného stresu, kdy uzavření průduchů vede jednak ke snížení ztrát vody listy transpirací, jednak ke snížení hydraulického

gradientu, což rostlině umožní ušetřit vodu v půdě na později. Při působení mírného stresu se zdá být mnohem účinnější strategií schopnost udržet průduchy otevřené (Tardieu 2012).

Nárůst P_N , který jsem u citlivé linie 2023 zaznamenala na počátku sucha a u odolného genotypu CE704 i při šestidenní periodě bez zalévání, byl v naší i ve spolupracující laboratoři pozorován i během jiných pokusů s různými druhy rostlin stresovanými vodním deficitem (Holá, Hnilička *osobní sdělení*), není to tedy náhodný jev. Mohlo by to být vysvětleno např. tím, že rostliny v nejranější fázi stresového období dokážou detekovat nepříznivé podmínky prostředí a pokoušejí se přechodným zvýšením intenzity fotosyntetických procesů na ně připravit. U citlivých genotypů tato situace trvá pouze krátce, odolnější genotypy dokážou udržet vysokou účinnost fotosyntézy i při prodloužení vodního deficitu. Při podrobnějším porovnání komplexní reakce citlivého genotypu 2023 a odolnějšího genotypu CE704 v podmínkách mírného (šestidenního) sucha se rozdílná citlivost k suchu projevila především v tom, že u genotypu CE704 zřejmě déle trvala počáteční fáze stresové reakce, kdy fotosyntéza zůstávala vysoce účinná. Naopak u genotypu 2023 již po 6 dnech stresu docházelo k omezení fotosyntézy, pravděpodobně v důsledku uzavírání průduchů. Zdá se, že rozdíl v citlivosti obou kontrastních genotypů byl založen na délce trvání schopnosti udržovat fotosyntézu na relativně vysoké úrovni a utvářet si tak energetickou a metabolickou zásobu potřebných buněčných složek k vyrovnání se s působením sucha. Výhodnost strategie otevřených průduchů za mírného stresu (Tardieu 2012) by tedy mohla platit obecně, délka sucha představující mírný stres by se však v mém případě mezi oběma zkoumanými kontrastními inbredními liniemi lišila. Odolnost rostliny obecně lze označit jako délku periody, během níž je rostlina schopna suchu vydržet a následně po zalití obnovit normální metabolismus. Citlivost/odolnost genotypů, určovaná např. během různých šlechtitelských programů, by se tedy možná dala vyvodit z délky trvání a z efektivity počáteční fáze stresové reakce se zvýšenou fotosyntetickou aktivitou, během níž jsou rostliny schopny syntetizovat metabolity, jimiž je pak následující reakce na stres ovlivněna, případně vylepšena. Genotypy, které to dokáží déle, získávají výhodu čelit stresu, než dojde k případné obnově dodávky vody.

Zajímavé nesrovnalosti jsem pozorovala také mezi výsledky gazometrických měření a konzistentním poklesem RWC, účinností PSII a obsahu fotosyntetických pigmentů v důsledku mírného a silnějšího stresu suchem. Vodní stav rostliny není pochopitelně dán pouze ztrátou vody z listů (spojenou s účinností transpirace a uzavřením průduchů), ale také příjmem vody kořeny a jejím transportem do různých částí rostlin. Některé genotypy s větším kořenovým systémem nebo s menším poměrem nadzemní část/kořeny mohou přijímat vodu z půdy a transportovat ji mnohem efektivněji, a nepotřebují tudíž uzavírat průduchy ve stejný okamžik jako méně přizpůsobené genotypy, které rychle reagují na sucho snížením E. Udržování otevřených průduchů ovšem může vést k větší ztrátě vody projevené poklesem RWC. Tuto situaci jsem pozorovala u odolnějšího genotypu CE704 v podmínkách mírného sucha, který dokonce zvýšil otevřenost průduchů, zřejmě aby zintenzívněl P_N i na úkor ztrát vody z listů. Protože je však tento genotyp celkově menší a zejména má nižší poměr velikosti nadzemní části vůči kořenům, voda čerpaná kořenovým systémem by u CE704 mohla být stále ještě dostatečná pro zásobení menší nadzemní části rostlin v porovnání s jinými genotypy. Při prodloužení periody bez zalévání již hodnoty RWC u CE704 byly víceméně na úrovni hodnot naměřených u citlivého genotypu 2023. Rostliny (i stresované) mezitím o něco povyroستly, množství vody dostupné pro kořeny se snížilo a je možné, že kdyby CE704 v této situaci udržoval g_s na stejné úrovni jako při šestidenním stresu, ztráta vody by mohla být již neúnosná. Částečným omezením g_s (byť menším než u citlivého genotypu) se s tím však mohl vyrovnat a přesto si ještě udržet dostatečně aktivní fotosyntetické procesy.

Pokles účinnosti primárních fotosyntetických procesů, který jsem ve svých pokusech pozorovala, byl mnohem výraznější při prodloužení stresu nebo při suchu v kombinaci s vysokou teplotou. To je v souladu s tím, že primární fotosyntetické procesy jsou považovány spíše za odolné vůči vodnímu deficitu (Cornic *et al.* 2002, Chaves *et al.* 2002, Lawlor *et al.* 2002, Baker *et al.* 2004, Chaves *et al.* 2004, Reddy *et al.* 2004). Snížení účinnosti fotosyntetického elektron-transportního řetězce při dehydrataci se pravděpodobně objevuje až sekundárně v důsledku nerovnováhy mezi tvorbou NADPH a jeho využitím ve fotosyntetickém cyklu fixace uhlíku (Cornic *et al.* 2002, Baker *et al.* 2004). Silný stres suchem může vést ke zvýšené produkci ROS vedoucích k fotooxidaci a degradaci fotosyntetických membránových proteinů a s nimi asociovaných pigmentů a lipidů (Cornic *et al.* 2002, Yordanov *et al.* 2003, Reddy *et al.* 2004). To vše se pak může odrazit i na celkové účinnosti fotosyntézy. Bylo nicméně zajímavé, že zatímco v podmínkách mírného (šestidenního) sucha jsem při hodnocení souboru 25 inbredních linií pozorovala pozitivní korelaci mezi P_N a primárními fotosyntetickými procesy nebo obsahem fotosyntetických pigmentů

stanoveným na základě indexů spektrální odrazivosti a v podmínkách silnějšího (desetidenního sucha) se tato korelace ještě zvýraznila, při hodnocení jiného genotypového souboru v podmínkách sucha v kombinaci s vysokou teplotou pro většinu genotypů neexistovala žádná korelace mezi P_N a těmito parametry. Vztah mezi celkovou fotosyntetickou účinností a jejími dílčími složkami tedy očividně závisí jak na konkrétních podmínkách simulace sucha, tak na konkrétním genotypovém složení analyzovaného souboru.

U charakteristik popisujících primární fotosyntetické procesy jsem větší odezvu pozorovala u parametrů souvisejících s PSII než s PSI, resp. s celým elektron-transportním řetězcem. Bylo to zřejmě především v podmínkách silnějšího stresu suchem. Často se uvádí, že PSII je citlivějším fotosystémem, více reagujícím na různé stresové faktory (i když v některých případech, zejména při stresu nízkou teplotou je tomu možná naopak; Terashima *et al.* 1994, Sonoike 1995), což je pravděpodobně spojeno s tím, že dlouhodobější působení mnoha stresorů vyvolává fotooxidační poškození složek fotosyntetického elektron-transportního řetězce. K tomu jsou náchylné zřejmě především složky RC PSII, vnitřní antény PSII (zejména D1 a D2 a CP43 proteiny) a OEC (Murata *et al.* 2007, Takahashi *et al.* 2008). Již z hodnot fluorescenčních parametrů byl v mém případě rozdíl mezi účinností PSII a PSI (resp. celého elektron-transportního řetězce) patrný: hodnoty parametrů souvisejících s PSII se v důsledku sucha snížily výrazněji než u parametrů spojených s přenosem elektronů až na koncové akceptory PSI, přičemž největší rozdíl byl u odolnějšího genotypu CE704. Ještě lépe byl tento jev patrný z aktivit PSII a PSI měřených v izolovaných chloroplastech.

Změny aktivit fotosystémů analyzovaných takto v podmínkách *in vitro* byly závislé na parametrech, ke kterým byly vztahovány, což pozorovali i jiní autoři (Bravdo *et al.* 1982, Camp *et al.* 1982, Krebs *et al.* 1996, Synková *et al.* 1997). Největší rozdíl mezi oběma fotosystémy byl zřejmý při přepočtu těchto charakteristik na jednotkové množství Chl v chloroplastových suspenzích. Tento způsob vyjádření víceméně odpovídá maximální možné aktivitě příslušných komplexů elektron-transportního řetězce v podmínkách, kdy není nijak omezena dostupnost donorů/akceptorů elektronů (jsou dodávány uměle v dostatečném množství) a rovněž ozáření je optimální. Jediný faktor, který aktivity fotosystémů limituje, je tedy reálné množství funkčních RC v chloroplastech. Při ostatních typech vyjádření (na jednotku listové plochy, hmotnosti suché či čerstvé biomasy) již do hry vstupují i další faktory spojené zejména s celkovým obsahem Chl, anatomií listu, obsahem vody a metabolismem rostliny. Řada autorů, kteří pracují s izolovanými chloroplasty a vyjadřují jejich fotochemickou aktivitu v přepočtu na tyto jednotky, se bohužel neobtěžuje při přepočtech použít separátně stanovené hodnoty obsahu Chl a/nebo SLW, a vychází z plochy nebo hmotnosti suché (čerstvé) biomasy původního vzorku listového pletiva, ze kterého byly chloroplasty izolovány. To je samozřejmě nesprávné a může vést k zavádějícím výsledkům, protože při homogenizaci, která je nezbytnou součástí jakéhokoli postupu izolace chloroplastů, dochází ke ztrátám, které se mohou mezi různými vzorky (genotypy, kontrolními vs stresovanými rostlinami atd.) někdy i dost výrazně lišit vzhledem k případným rozdílům v tloušťce listu, obsahu vody aj. Výsledky měření aktivit PSII, PSI nebo WETC v izolovaných chloroplastech závisí také na tom, zda se použije či nepoužije látka sloužící jako inhibitor pH gradientu přes tylakoidní membrány, tj. „odpřahovač“ elektronového transportu a fotofosforylace. To bylo v mém případě dobře vidět u rostlin stresovaných šestidenním suchem, kde rozdíl mezi kontrolními a stresovanými rostlinami byl větší u „odpřažených“ aktivit. Podobně větší vliv vysušení listů na „odpřažené“ než na „spřažené“ fotochemické aktivity popsali již před čtyřiceti lety Keck *et al.* (1974) v chloroplastech izolovaných ze slunečnice. U rostlin kukuřice stresovaných desetidenním suchem jsem již rozdíly mezi elektronovým transportem spřaženým nebo odpřaženým od fotofosforylace příliš nepozorovala, protože složky fotosyntetického aparátu tylakoidních membrán byly patrně více poškozeny; určitý (avšak malý) rozdíl byl zachován pouze v případě odolnějšího genotypu CE704.

Porovnání vlivu různých délek period stresu na rostliny je poměrně oblíbeným tématem u mnoha druhů rostlin, a to i při detailních rozborech změn na molekulární úrovni. V proteomických studiích zaměřených na studium vlivu sucha na rostliny se rozdíly mezi trváním různě dlouhých období sucha nejčastěji pohybují v rozpětí 1 až 4 dny, což by předpokládalo, že by se očekávaný rozdíl v reakci rostlin v závislosti na délce stresu mohl již v rámci tohoto rozpětí projevit (Durand *et al.* 2011, Ford *et al.* 2011, Sergeant *et al.* 2011, Kosmala *et al.* 2012, Maksup *et al.* 2012, Mirzaei *et al.* 2012a). Já jsem na základě svých počátečních pokusů zvolila dva hlavní časové body: 6 a 10 dnů sucha, tedy již zmíněný „přelomový bod“ a dobu, kdy byly rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami už velmi zřetelné v naprosté většině studovaných charakteristik. Zachovala jsem tedy také rozpětí čtyř dnů.

Rozdíl na úrovni listových proteinů jsem v pokusech s rostlinami vystavenými mírnému stresu suchem analyzovala dvěma odlišnými proteomickými metodami, 2-DGA a iTRAQ. iTRAQ je proteomická technika druhé generace, která slouží ke kvantitativní analýze bez použití gelové elektroforézy. Tato metoda umožňuje analýzu proteinů přítomných v malém množství a proteinů, které jsou obtížně děleny pomocí 2-DGE. iTRAQ je však tzv. shotgun metoda, která sleduje několik tisíc peptidů bez možnosti předvýběru odlišně reagujících proteinů před MS analýzou. Oproti tomu běžné 2-DGE metody, ať už spojené s barvením proteinů stříbrem nebo založené na DIGE, umožňují detekci menšího množství proteinových skvrn, ale následná identifikace prostřednictvím MS může být výhodněji aplikovaná pouze na proteiny, které se významně liší mezi analyzovanými vzorky. 2-DGE analýza a její varianty by mohly být také vhodnější pro detekci změn na úrovni izoform proteinů. V mém případě se u HSP26 proteinu takto podařilo identifikovat opačnou regulaci dvou různých izoform tohoto proteinu v obou hodnocených genotypech v důsledku mírného stresu suchem. Různé izoformy mohou být výsledkem paralogních genů nebo mohou pocházet ze stejného genu po alternativním sestřihu nebo posttranslačních modifikacích. 2-DGE analýza celkového proteomu u semen kukuřice ukázala, že pouze asi 30 % identifikovaných proteinů bylo přítomno pouze jako jedna skvrna; většina proteinů byla přítomna ve více izoformách (Méchin *et al.* 2004). Podobně Vincent *et al.* (2007) pozorovali, že více než 40 % proteinových skvrn (ze 191 na gelu z jejich 2-DGE) bylo redundantních u stresovaných rostlin vinné révy.

Při studiu listového proteomu dvou kontrastních genotypů kukuřice jsem na 2-D gelech našla pouze 17 proteinových skvrn s odlišným výskytem/intenzitou v závislosti na genotypu či pěstování, kdežto počet takových proteinů nalezených pomocí iTRAQ (vykazujících minimálně dvojnásobný rozdíl mezi jednotlivými vzorky) přesáhl 200. Rozdíl byl tedy více než desetinásobný. Robbins *et al.* (2013), kteří srovnávali proteom perikarpu u rostlin kukuřice s mutací v jednom genu ovlivňujícím pigmentaci perikarpu a u normálních rostlin, našli pomocí DIGE 61 proteinů a pomocí iTRAQ 122 proteinů s odlišným množstvím mezi oběma studovanými variantami, ale v práci Zhao *et al.* (2008), která analyzovala proteom svěřacích buněk průduchů huseníčku Thalova pomocí 2-DGE a jiného přístupu nezávislého na gelové elektroforéze (2-D LC-MALDI MudPIT), našli její autoři dokonce téměř 30% rozdíl mezi oběma metodami ve prospěch negelového přístupu. Překryv mezi výsledky mých dvou proteomických přístupů byl malý, což vyplývalo z odlišných vlastností těchto metod; jak příprava vzorků, tak následná analýza se na mnoha úrovních lišily. Běžnou 2-DGE mohou být detekovány pouze poměrně hojné proteiny v rámci rozmezí pI 3 až 11, kdežto metoda iTRAQ má úplně jiná omezení (Wu *et al.* 2006). Malý překryv výsledků tedy není neobvyklý. Alvarez *et al.* (2009), kteří analyzovali kořenový proteom rostlin brukve vystavených stresu zvýšeným množstvím kadmia pomocí jak DIGE, tak iTRAQ, také pozorovali pouze 12% překryv mezi výsledky obou metod.

Delší perioda stresu měla na rostliny podle očekávání negativnější účinek než kratší perioda, což bylo zřejmé nejen ze změn morfologických i fyziologických charakteristik, ale i z analýzy změn v množství listových proteinů. U rostlin citlivé inbrední linie 2023 vystavených šestidennímu suchu jsem ve srovnání s odolnější linií CE704 pozorovala obecně nižší množství indukovaných proteinů. To by mohlo souviset s odlišnou regulací translace u obou studovaných genotypů. Rozdílnou reakci obou genotypů v podmínkách mírného stresu suchem totiž vykazovaly některé proteiny podílející se na regulaci translace. Množství EF-TuM (mitochondriálního translačního elongačního faktoru) a proteinu identifikovaného jako podjednotka eukaryotního translačního iniciačního faktoru 3 (eIF3) bylo po 6 dnech dehydratace v listech CE704 zvýšeno, zatímco u citlivého genotypu 2023 se množství těchto proteinů v porovnání s kontrolními rostlinami neměnilo. eIF3 se podílí na iniciaci proteosyntézy, váže se k 40S podjednotce ribozómu a spolu s dalšími iniciačními faktory podporuje navázání mRNA a methionyl-tRNA (Trachsel *et Staehelin* 1979). Také Ashoub *et al.* (2013) u ječmene stresovaného suchem popsali nárůst množství dvou translačních elongačních faktorů pouze u odolného genotypu. Hladina translačního elongačního faktoru eEF1D, který stimuluje výměnu GDP vázaného k EF-1 α za GTP (Peters *et al.* 1995), byla u genotypu 2023 v důsledku mírného sucha výrazně snížena, avšak u CE704 nikoliv, navíc jsem u CE704 vysokou hladinu tohoto proteinu pozorovala na rozdíl od 2023 již u kontrolních rostlin. Podobně Zhao *et al.* (2011) pozorovali snížení množství EF-Tu v důsledku sucha u citlivého genotypu troskutu, ale nikoli u odolného genotypu. Změny v množství různých složek translačního aparátu by mohly mít vliv na sníženou proteosyntézu u genotypu 2023 v podmínkách mírného sucha, což je v souladu i s obecně nižším množstvím indukovaných proteinů nalezených u stresovaných rostlin tohoto genotypu a také s nižší úrovní jejich indukce.

V podmínkách desetidenního sucha se počet indukovaných proteinů mezi oběma genotypy vyrovnal (a obdobný byl i u jejich F1 kříženců). To bylo způsobeno tím, že u odolnějšího genotypu CE704 nedocházelo při prodloužení periody sucha na 10 dnů k zvyšování obsahu tolika proteinů jako při krátkodobém stresu, a to napříč všemi kategoriemi (výrazně zejména u enzymů metabolismu sacharidů). U citlivé linie 2023 se počet proteinů indukovaných desetidenním suchem oproti šestidennímu suchu příliš nezměnil. Rozdíly v množství translačních faktorů, nalezené mezi oběma kontrastními inbredními liniemi při šestidenním suchu, jsem v těchto podmínkách již nepozorovala, což by ukazovalo na to, že regulace proteosyntézy na úrovni translace je spíše jemným regulačním mechanismem, který s odolností k suchu souvisí pouze za relativně mírných stresových podmínek. V některých případech však došlo ke snížení hladin translačních elongačních faktorů u křížence 2023×CE704, u něhož byl negativní vliv stresu suchem velmi výrazný. Vzhledem k tomu, že u tohoto křížence došlo celkově k nejvyššímu poklesu množství různých proteinů, vykazoval snížené hladiny cytosolických ribozomálních proteinů a některých enzymů podílejících se na syntéze/metabolismu aminokyselin, lze předpokládat, že to odráželo vysokou úroveň utlumení buněčného metabolismu.

Rostliny genotypu CE704 vystavené mírnému stresu suchem vykazovaly také vyšší hladinu několika enzymů podílejících se na syntéze a metabolismu aminokyselin, zatímco pro citlivou linii 2023 bylo typické snížení hladiny většiny těchto proteinů. Tento jev by také mohl potvrzovat moji hypotézu ohledně odlišné regulace proteosyntézy u těchto dvou genotypů v podmínkách mírného sucha. Xu *et al.* (2010a) u dvou kultivarů lipnice lišících se tolerancí k suchu pozorovali podobnou situaci, s nižším poklesem množství proteinů spojených s metabolismem aminokyselin u tolerantního kultivaru ve srovnání s citlivým. Také Ye *et al.* (2013) popsali u odolného genotypu pšenice zvýšenou expresi některých klíčových enzymů při syntéze aminokyselin, zatímco u citlivého genotypu nikoli. V podmínkách silnějšího stresu suchem jsem však nemohla konstatovat nějaký obecnější trend v reakci množství enzymů metabolismu aminokyselin na tento stresový faktor – u některých z těchto proteinů došlo ke zvýšení jejich množství, u jiných k poklesu. Souviselo to zřejmě s tím, že syntéza/přeměna aminokyselin v buňkách neovlivňuje pouze proteosyntézu, ale řadu dalších buněčných procesů. Poměrně konzistentní, byť slabý nárůst hladin u všech studovaných genotypů v těchto podmínkách pěstování pokusných rostlin vykazovaly např. alaninaminotransferáza, fosfoserinaminotransferáza, methioninsyntáza a glutamátdekarboxyláza. Tyto enzymy mají roli při metabolismu aminokyselin. Fosfoserinaminotransferáza katalyzuje vznik fosfoserinu z fosfohydroxypyruvátu (Ho *et al.* 1998), methioninsyntáza katalyzuje konečný krok při regeneraci methioninu z homocysteinu (Ravanel *et al.* 1998). Mohou svou funkcí také ovlivňovat energetický metabolismus či obecnou reakci na stres. Alaninaminotransferáza je enzym, který se účastní mnoha metabolických drah, kde katalyzuje reverzibilní přenos aminoskupiny z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a glutamátu. U rostlin s C4 typem metabolismu (mezi něž patří i kukuřice) tento enzym může fungovat i při přenosu C3 jednotek mezi cytolem mezofylových buněk a buněk pochev cévních svazků pro udržování N/C rovnováhy ve dráze C4-dikarboxylových kyselin (Son *et al.* Sugiyama 1992). Glutamátdekarboxyláza se podílí na syntéze kyseliny γ -aminomáselné (GABA) z glutamátu (Baum *et al.* 1993). U rostlin byly identifikovány metabolické dráhy, které spojují funkci GABA se stresovým metabolismem. Rychlá akumulace GABA ve stresované tkáni může být zásadním spojením mezi rozpoznáním environmentálního stresu a včasnou fyziologickou odpovědí (Kinnersley *et al.* Turano 2000).

Naopak pokles množství v důsledku prodloužené stresové periody jsem pozorovala např. u serinhydroxymetyltransferázy, což je enzym katalyzující přeměnu serinu na glycín při fotorespiraci a bylo popsáno, že rostliny, které jej mají nefunkční, vykazují horší reakci na stresové faktory (Moreno *et al.* 2005). Také chloroplastová glutamát/oxalacetáttransamináza neboli aspartátaminotransferáza, která katalyzuje reverzibilní přeměnu glutamátu a aspartátu na jejich 2-keto analogy oxaloacetát a 2-oxoglutarát, měla v listech rostlin všech čtyř studovaných genotypů stresovaných desetidenním suchem snížené množství oproti kontrole. Aspartátaminotransferáza je klíčovým enzymem syntézy aminokyselin a obecně hraje důležitou roli při celkové regulaci metabolismu uhlíku a dusíku (Zhou *et al.* 2009).

Co se týče změn množství cytosolických ribozomálních proteinů u rostlin stresovaných suchem, podle údajů v literatuře se nedá jednoznačně říci, jaká je jejich reakce na tento typ stresoru. Existují případy, kdy v důsledku sucha došlo k výraznému poklesu množství některých ribozomálních proteinů (např. Shu *et al.* 2010, Tai *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2011, Cramer *et al.* 2013, Zadražník *et al.* 2013), ale jiní autoři naopak popsali nárůst množství (Yang *et al.* 2010a, Oliver *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2011). Záleží zřejmě na konkrétním proteinu, na konkrétních podmínkách stresu suchem, na druhu

rostliny a pravděpodobně i na genotypu. V mém případě jsem zaznamenala spíše zvýšené množství cytosolických ribozomálních proteinů. V podmínkách mírného stresu suchem se to týkalo pouze dvou proteinů u linie 2023, v podmínkách silnějšího sucha několika proteinů 40S ribozomální podjednotky u linie CE704, v případech dalších proteinů a dalších genotypů došlo sice také ke zvýšení množství, ale nebylo příliš výrazné. Při prodloužené periodě vodního deficitu ale došlo u křížence 2023×CE704, u něhož byl negativní vliv stresu suchem velmi výrazný, i k poklesu množství některých cytosolických ribozomálních proteinů. U tohoto křížence jsem také za těchto podmínek zaznamenala snížené množství (v některých případech dokonce velmi výrazné) mnoha chloroplastových ribozomálních proteinů. Slabý pokles obsahu chloroplastových ribozomálních proteinů jsem při prodloužení stresové periody na 10 dnů pozorovala i u linie 2023. Vzhledem k tomu, že u linie 2023 mělo v podmínkách desetidenního sucha více proteinů snížené množství v listech stresovaných rostlin než při šestidenním suchu, přičemž se to týkalo zejména fotosyntetických proteinů, a kříženec 2023×CE704 vykazoval vysloveně extrémně vysoký pokles hladin mnoha fotosyntetických proteinů v důsledku sucha, mohlo by to ukazovat na omezení proteosyntézy právě v chloroplastech a v důsledku vést ke snížení celkové efektivity fotosyntetických procesů. To by bylo vesměs v souladu s rozdíly, které jsem mezi studovanými genotypy pozorovala ve funkčních fotosyntetických charakteristikách.

Zvýšené množství proteáz, které jsem pozorovala u stresovaných rostlin obou kontrastních linií v podmínkách šestidenního sucha, by mohlo ukazovat na vyšší rychlost degradace poškozených nebo nadbytečných proteinů během stresových podmínek. O této oblasti se toho v souvislosti se suchem zatím mnoho neví (Vaseva *et al.* 2012). Pinheiro *et al.* (2005) popsali indukci různých proteáz u rostlin lupiny vystavených nedostatku vody, Huerta-Ocampo *et al.* (2009) pozorovali zvýšené množství enzymů spojených s ubiquitinem (podílejících se na značení proteinů pro degradaci v proteazómu) v listech stresovaných rostlin laskavce a Aranjuelo *et al.* (2011) zaznamenali zvýšení množství podjednotek proteazómu v listech vojtěšky při vystavení vodnímu deficitu. Ve všech případech šlo zřejmě o poměrně mírný stres suchem. Nárůst hladin proteazómových proteinů a zvýšená hydrolýza proteinů byly pozorovány i v listech kukuřice nebo pšenice vystavené simulaci osmotického stresu pomocí krátkodobého vystavení rostlin PEG (Tai *et al.* 2011, Ye *et al.* 2013). Když jsem však prodloužila periodu sucha na 10 dnů, množství proteáz v listech stresovaných rostlin nebylo příliš rozdílné oproti rostlinám kontrolním a u některých proteinů patřících do této skupiny (jako v případě proteolytické podjednotky Clp proteázy závislé na ATP u křížence 2023×CE704) jsem dokonce zaznamenala poměrně výrazný pokles hladiny. I zde se tedy zdá, že případná regulace množství proteinů prostřednictvím jejich degradace je citlivou a selektivní záležitostí, závisající na konkrétním proteinu, síle stresu a na tom, jak moc se u určitého genotypu nebo rostlinného druhu negativní účinky působení stresového faktoru projeví.

Další možnost, jak v rámci strategie přizpůsobení se na stres suchem („drought tolerance“) mohou rostliny chránit své buňky před poškozením a vypořádat se s poškozenými, resp. nesprávně složenými proteiny, je indukce syntézy proteinů účastnících se ochrany před denaturací a usnadnění renaturace chybně složených proteinů (Taylor *et al.* 2009). Když jsem srovnávala dvě inbrední linie kukuřice, vykazující odlišnou citlivost na sucho, v podmínkách mírného (šestidenního) vodního deficitu, celkem podle očekávání jsem jako nejzastoupenější funkční kategorii proteinů reagujících na sucho identifikovala různé chaperony, chaperoniny a sHSP a jiné proteiny s podobnou funkcí. Rovněž při prodloužení sucha/zvýšení jeho intenzity byla tato funkční kategorie významně zastoupena mezi proteiny indukovanými tímto stresovým faktorem u všech čtyř studovaných genotypů. Kromě sHSP a jiných chaperonů se v listech rostlin kukuřice vystavené šestidennímu i desetidennímu suchu akumulovaly také dehydriny, zástupci druhé skupiny LEA proteinů. Množství těchto proteinů se obecně zvyšuje spolu s jinými LEA proteiny v reakci na různé typy stresových faktorů a při dehydrataci je jejich exprese indukována u mnoha druhů rostlin (Wood *et al.* 1997, Goldsbrough 1997, Cellier *et al.* 1998, Close 2006, Zhao *et al.* 2011). Dehydriny jsou důležité pro zachování stability membránových proteinů a úpravu buněčného osmotického tlaku a také pro stabilizaci makromolekul a ochranu buněčných proteinů před degradací navázáním molekul vody na jejich povrch (Mohammadkhani *et al.* 2008). Někteří autoři předpokládají, že tyto LEA proteiny by také mohly působit jako speciální forma molekulárních chaperonů, které by zabraňovaly interakcím mezi denaturovanými proteiny a jejich agregací indukované vodním deficitem, a umožňovaly by přechod z neuspořádaného do uspořádaného stavu neboli tzv. indukované skládání proteinů (Agoston *et al.* 2011, Veeranagamallaiah *et al.* 2011, Vaseva *et al.* 2012).

Dehydriny, sHSP a jiné chaperony patřily v mém případě také mezi proteiny, které vykazovaly obecně nejsilnější reakci na stresové podmínky, což bylo prokázáno jak 2-DGE, tak

iTRAQ analýzami listového proteomu jak u šestidenní, tak u desetidenní periody bez zalévání. Nejméně byly přitom indukovány u odolnější linie CE704, zatímco u citlivé linie 2023 a (v případě desetidenního sucha) u křížence 2023×CE704 bylo jejich množství u stresovaných rostlin výrazně zvýšeno. Zajímavé bylo, že reciproký kříženec CE704×2023, jehož mateřským genotypem je linie CE704, tak výraznou indukci těchto proteinů nevykazoval, ale ve srovnání s ostatními genotypy měl vyšší hladiny především dehydrinů již v kontrolních podmínkách. Je tedy možné, že – byť se u něho stres projevoval silněji než u linie CE704, „nepotřeboval“ množství těchto proteinů při vystavení suchu zvýšit tolik jako jeho sesterský genotyp 2023×CE704 nebo linie 2023.

Autoři několika studií popsali akumulaci sHSP a dehydrinů i u jiných druhů rostlin, ať už se jednalo o trávy jako kukuřice (Mohammadkani *et al.* 2008, Hu *et al.* 2010b), pšenice (Ford *et al.* 2011), ječmen (Ashoub *et al.* 2013), rýže (Shu *et al.* 2011, Mirzaei *et al.* 2012a), cukrová třtina (Jangpromma *et al.* 2010) či lipnice luční (Xu *et al.* 2010a), nebo dvouděložné rostliny – topol (Bonhomme *et al.* 2009a, b) vinná réva (Cramer *et al.* 2013), fazol (Zadrazil *et al.* 2013) nebo rostlina *Carissa spinarum* (Zhang *et al.* 2010a). Na rozdíl od mého zjištění však někteří autoři považují zvýšení množství sHSPs během dehydratace za znak odolnosti k suchu a popisují situace, kdy u odolných genotypů hladiny těchto proteinů narůstají více než u citlivých (Salekdeh *et al.* 2007, Bonhomme *et al.* 2009b, Xu *et al.* 2010a, Ashoub *et al.* 2013), i když např. Ford *et al.* (2011) u pšenice takto jednoznačné výsledky nedostali. Také vnesení genu pro jeden sHSP do rostlin rýže nemělo za následek lepší odolnost k suchu, i když transgenní rostliny byly schopny po skončení stresového období lépe obnovit normální fyziologické procesy (Sato *et al.* 2008). Je možné (a pravděpodobné), že souvislost mezi akumulací sHSP a odolností k suchu závisí jak na rostlinném druhu, tak na konkrétních podmínkách nedostatku vody, vývojovém stádiu rostliny apod.

V případě dehydrinů naopak Zhao *et al.* (2011) uvádějí jejich akumulaci jako obecný příznak reakce na stres suchem a nikoli jako doklad odolnosti/citlivosti genotypu. Já jsem u silnějšího stresu jednoznačně pozorovala nižší nárůst množství dehydrinů u odolnější linie CE704 a méně citlivého křížence CE704×2023, ale u mírného šestidenního stresu naopak množství dehydrinů více vzrostlo u CE704 než u citlivé linie 2023. Domnívám se, že u obou těchto skupin proteinů (dehydrinů, chaperonů spojených se stresovou reakcí) může být zvýšení jejich množství u stresovaných rostlin jak příznakem zvýšené potřeby oprav a ochrany, a tudíž zvýšeného poškození buněk, tak příznakem snahy tomuto poškození zabránit (podobně, jako se to někdy uvádí u antioxidantních proteinů a dalších ochranných buněčných složek). Výhodou by rozhodně mohla být existence zvýšeného množství těchto proteinů ještě před stresem (jako v mém případě alespoň částečně u křížence CE704×2023), což by takovým rostlinám umožnilo lépe zamezit negativním důsledkům působení stresového faktoru hned, jak začne působit a vedlo by to k jejich menšímu poškození.

Proteiny, u nichž došlo v důsledku sucha k největšímu snížení obsahu, byly v případě krátkodobého stresu relativně různorodé, ale při prodloužení stresu ve většině případů patřily do kategorie proteinů primárních fotosyntetických procesů, syntézy či metabolismu fotosyntetických pigmentů a metabolismu sacharidů včetně enzymů fotosyntetické fixace uhlíku.

Změny obsahu LHC proteinů zachycujících světelnou energii byly pozorovány jako následek stresu suchem v mnoha proteomických studiích. Někdy došlo k jejich nárůstu (Ali *et al.* 2006, Shu *et al.* 2010, Oliver *et al.* 2011, Tai *et al.* 2011, Guha *et al.* 2013), někdy k poklesu (Xu *et al.* 2010b, Ford *et al.* 2011, Ghabooli *et al.* 2013, Valero-Galván *et al.* 2013), případně byl pozorován pokles nebo nárůst v závislosti na délce stresu (Durand *et al.* 2011). V mém případě došlo při kratší periodě stresu k mírnému poklesu obsahu proteinu Lhcb4 světlosběrného komplexu LHCII pouze u genotypu 2023, zatímco při dlouhodobém stresu byl u genotypu 2023 pokles obsahu tohoto a některých dalších světlosběrných proteinů o něco výraznější. Naproti tomu u genotypu CE704 zůstaly hladiny LHC v obou případech na úrovni kontrolních rostlin. Obecně ovšem záleží nejen na absolutní velikosti světlosběrné antény, ale i na její relativní velikosti v poměru k množství funkčních RC fotosystémů. Čím je tento poměr větší, tím méně energie je použito na fotochemické procesy a větší část zachycené energie je pak disipována (jako teplo nebo jako fluorescence Chl). V podmínkách mírného stresu suchem jsem u odolnějšího genotypu CE704 nezjistila v tomto ohledu rozdíl mezi kontrolními a stresovanými rostlinami, zatímco u citlivé linie 2023 došlo zřejmě k větší inaktivaci RC PSII. Při silnějším suchu se reakce obou inbredních rodičovských linií vyrovnala (došlo již ke snížení množství funkčních RC PSII i u CE704).

U křížence 2023×CE704 došlo během stresu k nejvýraznějšímu poklesu obsahu LHC proteinů. U reciprokého křížence CE704×2023 nemělo sucho na obsah těchto proteinů téměř žádný vliv, tento kříženec měl však v kontrolních podmínkách těchto proteinů nejméně za všech čtyř genotypů

analyzovaných v tomto experimentálním celku. Prostřednictvím světlosběrných antén rostliny zachycují energii slunečního záření, díky níž poté dochází k excitaci elektronů v RC PSII nebo PSI. Menší množství proteinů světlosběrných antén znamená menší potenciál k zachycení světelné energie a tudíž k nižší aktivitě fotochemických dějů na tylakoidní membráně. Během stresových podmínek by ale menší množství světlosběrných antén mohlo působit pro genotyp CE704×2023 jako výhoda, protože menší světlosběrné antény by znamenaly, že nedochází k tak účinnému zachycování světelné energie, což by ve spojení s omezenou vodivostí průduchů navozenou suchem (a tudíž sníženou kapacitou fotosyntetické fixace uhlíku) nevyvolalo tak výrazné přeredukování elektron-transportního řetězce a s tím spojené tvorby ROS. Reciproký F1 kříženec 2023×CE704 i citlivá rodičovská linie 2023 „museli“ při stresu množství LHC proteinů snížit (na rozdíl od CE704×2023), ale i tak u nich pravděpodobně docházelo k oxidativnímu stresu a složky fotosyntetického aparátu tylakoidních membrán (zejména proteiny PSII) byly u nich více poškozeny. Nicméně výrazné snížení hodnot funkčních parametrů popisujících primární fotosyntetické procesy v důsledku sucha jsem zaznamenala také u CE704×2023, což není úplně v souladu s předchozí hypotézou. S LHC komplexy jsou ovšem spojeny i některé ochranné fotosyntetické karotenoidy a pokud by jich bylo u křížence CE704×2023 menší množství (já jsem spektrofotometricky mohla analyzovat pouze obsah celkových Kar), mohlo by to vést k méně účinné ochraně fotosyntetického aparátu za stresových podmínek. To by mohlo také vysvětlit, proč byl nakonec pokles hodnot fyziologických parametrů při suboptimálních podmínkách u obou kříženců skoro stejný. Nezměněný obsah proteinů navíc nezaručuje jejich nezměněnou aktivitu. Poškození či inaktivace fotosyntetických proteinů v důsledku stresu (neprojevující se poklesem jejich množství a nedetekovatelné iTRAQ analýzou) by také mohly být příčinou pozorovaného poklesu účinnosti fotosyntetických procesů u tohoto křížence.

Změny v důsledku sucha, které jsem pozorovala u některých proteinů OEC komplexu PSII, a u výše K-pásu znázorněného na křivkách diferenční kinetiky OJIP, který vypovídá o stupni inaktivace OEC, nejsou snadno interpretovatelné. V souladu byly oba typy těchto výsledků u křížence 2023×CE704, který vykazoval jak snížené hladiny některých OEC proteinů, tak největší inaktivaci OEC komplexu (podle výše K-pásu). U obou rodičovských genotypů byl při mírném suchu patrný pokles množství proteinu PsbP (23 kDa podjednotky), ale při silnějším suchu jsem nic takového nezaznamenala. Naopak u genotypu 2023 došlo ke snížení množství PsbO (33 kDa podjednotky) proteinu. Přitom podle grafu ΔW_{OJ} by měla linie 2023 v podmínkách mírného sucha mít více inaktivovaný OEC než CE704 a v podmínkách silnějšího sucha by měla být situace opačná. Nelze zřejmě než konstatovat, že i v tomto případě nemusí nepřítomnost změn množství proteinů nutně odrážet jejich nepoškozený stav, takže propojení mezi výsledky proteomických a fyziologických analýz nemusí být na první pohled zřejmé. V jiných studiích zaměřených na stres suchem bylo obvykle pozorováno spíše zvýšení obsahu PsbO (Riccardi *et al.* 2004, Caruso *et al.* 2009, Akashi *et al.* 2011, Merewitz *et al.* 2011, Sergeant *et al.* 2011, Tai *et al.* 2011, Wu *et al.* 2011, Cramer *et al.* 2013, Guha *et al.* 2013), i když někdy i pokles množství (Shu *et al.* 2010, Xu *et al.* 2010b), záleží tedy zřejmě jak na rostlinném druhu, tak na délce stresu (Valero-Galván *et al.* 2013), izoformě (Echevarría-Zomeño *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2010a) nebo odolnosti genotypu ke stresu (Xu *et al.* 2010a, Ford *et al.* 2011, Zadražník *et al.* 2013). Podobné reakce byly popsány i u PsbP – nárůst jeho množství v důsledku sucha uvádějí některé práce (Ali *et al.* 2006, Komatsu 2006, Gazanchian *et al.* 2007, Kottapalli *et al.* 2009, Xu *et al.* 2010a, b, Mohammadi *et al.* 2012a, Guha *et al.* 2013, Zadražník *et al.* 2013), pokles jiné práce (Echevarría-Zomeño *et al.* 2009, Huerta-Ocampo *et al.* 2009, Xu *et al.* 2010a, Zhang *et al.* 2010b, Durand *et al.* 2011, Zhao *et al.* 2011, Valero-Galván *et al.* 2013, Zadražník *et al.* 2013) a opět tyto změny mohly záviset na genotypu i rostlinném druhu.

U genotypu 2023 v důsledku mírného sucha hladina jednoho z proteinů vnitřní světlosběrné antény PSII (CP47) narostla, ale při silnějším suchu již klesla, spolu s množstvím sesterského CP43 proteinu. CP43 a CP47 jsou proteiny PSII, které vážou molekuly Chl *a* a hrají tudíž roli v zachycování světelné energie. Dále se prostřednictvím rozsáhlých lumenálních smyček pravděpodobně podílejí na oxidaci vody a tak mohou být považovány za část OEC spolu s ostatními vnějšími OEC proteiny (Barber *et al.* 2000). Změny v množství dalších proteinů PSII v důsledku mírného sucha jsem nezaznamenala, což je celkem v souladu s údaji v literatuře, kde se jako proteiny PSII s nejvýznamnějšími změnami hladin při stresu suchem uvádějí vesměs pouze proteiny OEC (kap. 2.2.2.1). Při silnějším stresu suchem však v mém případě došlo u genotypů 2023 a 2023×CE704 k některým význačným změnám PSII proteinů, které předtím v proteomických studiích zabývajících se touto tematikou popsány nebyly. Jednalo se o oba hlavní proteiny RC PSII, D1 a D2 (u křížence 2023×CE704 se jejich obsah snížil velmi výrazně) a dále cytochrom b_{559} α (PsbE protein). Ačkoliv je

PsbE vyžadován pro funkci PSII, není tento protein zahrnut v lineárním elektronovém transportu z vody na plastochinon. Místo toho se pravděpodobně podílí na CET kolem PSII, což je podpořeno schopností iontu železa v jeho hemové skupině přijmout (nebo darovat) elektron z akceptorové (nebo do donorové) strany PSII (Pospíšil 2011). Hem cytochromu b_{559} patří mezi kofaktory podílející se na sekundárních drahách přenosu elektronu v PSII, které mají PSII chránit před fotopoškozením za podmínek, kdy je inhibována primární dráha získání elektronu oxidací vody (Shinopoulos *et al.* Brudvig 2012).

Rovněž množství proteinu PsbH se v důsledku desetidenního sucha snížilo u všech studovaných genotypů, nejvýrazněji u citlivé linie 2023, která již v kontrolních podmínkách vykazovala o něco menší množství tohoto proteinu než odolnější genotyp CE704. Protein PsbH je nezbytný pro aktivitu PSII. Může hrát roli v regulaci skládání či stability PSII a může být také součástí oprav fotopoškozeného PSII při vysoké ozáření (Shi *et al.* Schröder 2004). Je nezbytný pro rychlou degradaci poškozených D1 molekul, což je důležité pro zamezení dalšího oxidačního poškození jádra PSII, a dále pro vkládání nově syntetizovaných D1 molekul do tylakoidní membrány. PsbH je tedy potřeba jak pro iniciaci, tak pro dokončení opravného cyklu komplexu PSII (Bergantino *et al.* 2003). U genotypu 2023×CE704 jsem zaznamenala také pokles hladiny proteinu PsbS, který je nezbytný jako pH senzor pro indukci xantofylového cyklu, a tedy zhášení přebytečné energie v podobě tepla (Shikanai 2007).

Podle změn na proteomické úrovni by tedy největším snížením účinnosti PSII měl v podmínkách mnou simulovaného silnějšího sucha trpět kříženec 2023×CE704, a to jak z důvodu úbytku hlavních podjednotek tohoto fotosystému podílejících se na přenosu elektronů nebo podjednotek souvisejících s ochranou proti fotooxidaci během stresu, tak i v důsledku zmenšení OEC komplexu, který je zdrojem elektronů z vody. Velký pokles účinnosti PSII, ačkoliv trochu menší než 2023×CE704, by měl mít i genotyp 2023. Pokles hodnot fluorescenčních parametrů popisujících děje v PSII i aktivit PSII měřených v suspenzích izolovaných chloroplastů byl však patrný i u zbývajících genotypů. Důvodem může být zřejmě přeredukování elektron-transportního řetězce, a tudíž zablokování dalšího přenosu elektronů či poškození proteinů PSII, které by se neprojevovalo přímo úbytkem jejich množství. V případě genotypu CE704 by mohla hrát roli i výrazně horší energetická konektivita mezi jednotlivými PSII, což by také mohlo vést k menší ochraně PSII před poškozením. Důvod snížení hodnot funkčních parametrů popisujících děje v PSII u F1 křížence CE704×2023 však není zcela jasný, pokud bychom nepřijali možnost vlivu menších světlosběrných antén (viz výše).

Aktivita PSI (nebo celého elektron-transportního řetězce) se během krátkodobého stresu suchem také snížila, do větší míry u citlivého genotypu 2023. Velikost hotovosti PSI akceptorů elektronů byla podle OJIP analýzy u stresovaných rostlin nižší než u kontroly, opět výrazněji u linie 2023 než u CE704. Mohla by zde být souvislost s poklesem obsahu ferredoxinu u 2023 a FNR u obou studovaných genotypů, zjištěným proteomickou analýzou. I v jiných studiích byl vlivem sucha obsah ferredoxinu (Jangpromma *et al.* 2010, Merewitz *et al.* 2011) a FNR (Caruso *et al.* 2009, Kottapalli *et al.* 2009, Xiao *et al.* 2009, Xu *et al.* Huang 2010a, Durand *et al.* 2011, Merewitz *et al.* 2011) snížen, mé výsledky jsou tedy v souladu s pozorováními jiných autorů. Dále jsem u obou inbredních linií při krátkodobém stresu suchem pozorovala protichůdnou reakci změn množství proteinu PsbK. Jeho obsah se při mírných stresových podmínkách snižoval u genotypu 2023 a naopak zvyšoval u CE704. Xu *et al.* Huang (2010a) u lipnice pozorovali nárůst obsahu PsbK podjednotky PSI bez ohledu na citlivost/odolnost genotypu k suchu, což může být dáno jiným rostlinným druhem nebo jinou metodou analýzy (v jejich případě DIGE). PsbK hraje roli v organizaci periferních světlosběrných komplexů u PSI a podílí se zřejmě na tzv. stavových přechodech LHC antén, kdy dochází k fosforylaci pohyblivých LHCI komplexů a ty poté přecházejí od PSII k PSI podle toho, kde je menší/větší potřeba energie záření. Rostliny s menším množstvím PsbK by mohly mít nižší kapacitu využít světelnou energii u PSI, takže redistribuce absorbované excitační energie mezi fotosystémy by tak byla snížena (Jensen *et al.* 2000). V mém případě by se to mohlo týkat citlivého genotypu 2023.

Při dlouhodobém stresu byl pokles účinnosti fotochemických procesů spojených s PSI výraznější a byl zaznamenán u všech pozorovaných genotypů, především však u kříženců. Jak již bylo řečeno výše, v důsledku silnějšího stresu suchem inbrední rodičovská linie 2023 a hlavně oba F1 kříženci reagovali uzavřením průduchů, což by mohlo být příčinou fotoinhibice PSI. Fotoinhibice PSI nastává v případě, kdy je nedostatek akceptorů elektronů NADP^+ a/nebo oxidovaného ferredoxinu kvůli nízké aktivitě fixace CO_2 , tudíž jsou elektrony zachyceny na akceptorové straně PSI v centrech $\text{F}_x/\text{F}_A/\text{F}_B$. Redukované formy těchto přenašečů reagují s H_2O_2 za vzniku hydroxylových radikálů, které

poškozuji PSI (Shikanai 2007). Jednou z možností, jak PSI ochránit, je aktivace CET kolem PSI, při němž z PSI elektrony přecházejí na ferredoxin, ale dále jsou z něj recyklovány zpět na plastochinon a odtud opět na PSI. Tímto způsobem se generuje ATP bez vzniku NADPH a dochází k okyselení tylakoidního lumen. Acidifikace spouští xantofylový cyklus, což je disipační proces, jehož prostřednictvím může být chlorofyl deexcitován a zamezí se vzniku singletového kyslíku a následnému oxidativnímu stresu. U cévnatých rostlin je cyklický transport kolem PSI zprostředkován dvěma způsoby – závislým na NDH a závislým na PGR5 proteinu. U PGR5-dependentní dráhy, kde pravděpodobně dochází k přenosu elektronu z ferredoxinu na plastochinon, není dosud zcela jasná dráha přenosu elektronů. Předpokládá se, že zde hraje nějakou roli protein PGR5, avšak jeho lokalizace ani funkční domény také nejsou zatím dostatečně známy. Existují i hypotézy, že PGR5 má v cyklickém transportu nepřímou funkci jako regulátor elektronového transportu. Druhá dráha závisí na aktivitě chloroplastového NDH komplexu. Chloroplastová DNA kóduje několik genů komplexu NDH, který se podílí na cyklickém elektronovém transportu okolo PSI, a to pravděpodobně tak, že odebírá elektrony z NADPH zpět na plastochinon. U zmíněných možností cyklického transportu elektronů stále zbývá několik nevyjasněných otázek ohledně jejich fungování (Shikanai 2007), ale je zřejmé, že rostliny jsou schopny tohoto potenciálu při působení stresu využít.

V podmínkách silného sucha jsem však u genotypu 2023×CE704 a menší měrou i u inbrední linie 2023 zaznamenala v důsledku dehydratace pokles množství proteinů podílejících se právě na CET kolem PSI, což mohlo souviset s poškozením či dokonce degradací některých podjednotek PSI. Analýza proteomu ukázala, že při delší periodě stresu trpěl největším snížením hladin proteinů PSI právě genotyp 2023×CE704, u něhož se výrazně snížilo množství podjednotek PsA a PsB tvořících RC PSI, a také proteinu PsC, což je stromální podjednotka PSI, která váže dva koncové elektronové akceptory F_A a F_B a dále interaguje i s ferredoxinem. PsC poskytuje nezbytné lyzinové zbytky pro rychlý elektronový přenos na ferredoxin (Fischer *et al.* 1998). O něco mírnější pokles obsahu hlavních složek PSI jsem pozorovala také u genotypu 2023 (PsA a PsC). Změny hladiny proteinu PsC s ohledem na genotyp byly již v souvislosti s dehydratací popsány i některými jinými autory (Xu *et al.* 2010a, Ford *et al.* 2011, Ghabooli *et al.* 2013), u obou hlavních podjednotek PSI jsem podobný údaj v proteomické literatuře nenašla.

Množství Ycf4 proteinu, hrajícího roli (nikoli však nezbytnou) při sestavování PSI (Krech *et al.* 2012) u genotypů 2023 a 2023×CE704 vystavených déletrvajícimu suchu také kleslo. U křížence 2023×CE704 se snížilo i množství proteinu PsN, jehož funkce není zatím úplně objasněna. PsN se vyskytuje jen u vyšších rostlin a je jedinou podjednotkou lokalizovanou úplně na lumenální straně PSI. Interaguje s jinými malými PSI podjednotkami (PsG a PsF). Vazba s PsG předpokládá roli PsN při zachycování světla, protože PsG je přilehlý k jednomu z LHCI proteinů. PsN by tak mohl působit jako spojka mezi LHCI a PSI. Mohl by však také mít funkci při optimalizaci elektronového toku, podobně jako PsF. PsN nicméně není pro skládání funkčního PSI a pro autotrofní růst rostlin nezbytný (Haldrup *et al.* 1999). Jediným proteinem PSI, který byl dlouhodobým suchem mírně indukován, byla podjednotka PsE, avšak pouze u genotypu 2023×CE704. PsE je periferní podjednotka komplexu PSI, která se podílí na vazbě ferredoxinu/flavodoxinu ke komplexu PSI a dále na CET kolem PSI (Lushy *et al.* 2002).

U genotypů CE704 a CE704×2023 se obsah proteinů PSI v listech stresovaných rostlin nelišil od rostlin kontrolních s výjimkou proteinu PsL u genotypu CE704, podílejícího se na stavových přechodech LHC antén. Rozdíly v obsahu proteinu PsL jsem detekovala zejména mezi rodičovskými liniemi. Za kontrolních podmínek vykazoval genotyp CE704 výrazně nižší obsah jedné izoformy proteinu PsL než genotyp 2023. Kříženci měli ve srovnání s genotypem CE704 výrazně vyšší množství tohoto proteinu a ve srovnání s 2023 tomu bylo naopak. Při silném stresu obsah PsL u CE704 navíc ještě klesl a rozdíl mezi CE704 a 2023 se tak ještě zvýraznil, což naznačuje, že LHC u tohoto genotypu zůstávají spíše u PSII. U vyšších rostlin PsL totiž interaguje s podjednotkou PsH. Bylo navrženo, že interakce s PsH brání tvorbě trimerů a umožňuje tak interakci PSI se světlosběrným komplexem II (LHCII) při stavových přechodech, což udržuje rovnováhu absorpce světla mezi PSI a PSII (Busch 2011). Je možné, že linie CE704 upřednostňuje v podmínkách stresu suchem menší poškození PSI na úkor poškození PSII. Mohly by to podporovat i výsledky mých měření fluorescence Chl. Kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI totiž v důsledku dlouhodobého sucha klesl u všech genotypů právě s výjimkou genotypu CE704. Velikost hotovosti PSI akceptorů u CE704 také zůstala na úrovni kontrolních rostlin, zatímco v důsledku sucha se zřejmě u obou kříženců a mírně i u linie 2023 snížila. I při měření aktivity PSI v suspenzích izolovaných chloroplastů reagoval genotyp CE704 na suchu lépe než ostatní tři genotypy a při

vyjádření této charakteristiky na jednotkové množství chlorofylu nebyly rozdíly mezi kontrolními a stresovanými rostlinami statisticky průkazné. Příčinou lepší reakce primární fotochemie PSI na suchu by mohl být u CE704 fakt, že u něj nebyla snížena fixace CO₂, tudíž nedocházelo k poškození tohoto odolnějšího fotosystému (u PSII k určitému poškození či omezení funkčnosti zřejmě došlo). Zároveň by mohl genotyp CE704 disponovat větším potenciálem CET kolem PSI než ostatní genotypy. To by však bylo třeba ještě dále ověřit.

Při působení sucha na procesy fixace uhlíku Calvinovým a Hatch-Slackovým cyklem byla sice zásadním faktorem pravděpodobně dostupnost CO₂ související s otevřeností průduchů, na proteomické úrovni ale také došlo k některým výrazným změnám, které mohly přispět k úpravě fotosyntézy u stresovaných rostlin. Největší pokles obsahu této skupiny proteinů nastal během sucha u inbrední linie 2023 a mírněji i u F1 křížence 2023×CE704. Tři proteiny s nejvýraznějším poklesem množství u genotypu 2023 byly GAPDH, PPKK a CP12. Obsah GAPDH, která katalyzuje přeměnu 1,3-bisfosfoglycerátu na glyceraldehyd-3-fosfát za spotřeby NADPH, mírně klesl i u obou kříženců. V této reakci se spotřebovává NADPH, takže úbytek enzymu podporuje přeredukování elektronového transportu. PPKK u C₄ rostlin katalyzuje fosforylaci pyruvátu za tvorby fosfoenolpyruvátu. Při aktivaci přechází ATP na AMP. Reakce spotřebovává produkt primární fáze fotosyntézy, tudíž při úbytku enzymu by ATP mělo být naopak v přebytku. CP12 je malý protein citlivý na redoxní stav chloroplastů. Jedinou jeho zatím jasně definovanou funkcí je regulace Calvinova cyklu prostřednictvím thioredoxinu. CP12 hraje roli při utváření komplexu mezi GAPDH a PRK při odpovědi na změnu intenzity ozáření. Při nízké ozářenosti vytvoření komplexu GAPDH/PRK/CP12 vyústí ve sníženou aktivitu jak PRK, tak GAPDH, při vysoké ozářenosti thioredoxin zprostředkuje disociaci komplexu a tím i zvýší aktivity obou enzymů. CP12 však může hrát širší roli při růstu a vývoji rostliny a při stresových podmínkách (López-Calcano *et al.* 2014).

U zbylých dvou genotypů se snížilo množství jen malého počtu enzymů fotosyntetické fixace uhlíku (např. u CE704 to byla aldoláza nebo SBPáza a u CE704×2023 protein regulující PPKK). Dále tu byly proteiny, jejichž hladina klesla v důsledku sucha u všech genotypů, a to jedna izoforma velké podjednotky Rubisco nebo PPKK. Naopak jediným proteinem, jehož hladina se během sucha zvýšila, byla RCA. U tohoto proteinu již jiní autoři popsali jak zvýšený (Salekdeh *et al.* 2002, Echevarría-Zomeño *et al.* 2009, Ji *et al.* 2012, Zadražník *et al.* 2013), tak snížený (Caruso *et al.* 2009, Jangpromma *et al.* 2010, Kang *et al.* 2012, Mohammadi *et al.* 2012a) obsah v listech rostlin různých druhů stresovaných nedostatkem vody. Rovněž u dalších ze zmíněných enzymů byly v předchozích proteomických studiích zaznamenány změny různého charakteru v důsledku sucha (viz kap. 2.2.2.2), v tomto ohledu tedy mé výsledky nejsou s předchozími v rozporu.

Moje práce tedy přinesla řadu zajímavých (a v některých případech zcela nových) zjištění týkajících se změn na úrovni proteomu v důsledku sucha a jejich případného propojení s reakcí rostlin na fyziologické a morfologické úrovni, a také rozdílů mezi genotypy vyznačujícími se různou odolností k suchu. Pozorovala jsem však také rozdíly mezi rodiči a jejich F1 kříženci a tyto mé výsledky mohou přispět k lepšímu pochopení dalšího dosud ne zcela objasněného biologického jevu – heteróze. F1 kříženci, které jsem ve své práci studovala, vykazovali především v kontrolních, ale někdy i ve stresových podmínkách ve srovnání s jejich inbredními rodičovskými liniemi vyšší hodnoty zejména některých morfologických a růstových charakteristik (výška rostlin, celková listová plocha, suchá hmotnost nadzemní části a kořenů). Z morfologického hlediska tedy rostliny kříženců disponovaly potenciálem pro větší a rychlejší růst a akumulaci biomasy, který také plně využily. Tento jev, kdy genotypy kříženců mají „lepší“ vlastnosti, než je průměr rodičů, se nazývá pozitivní heteróze (může samozřejmě dojít i k negativní heterózi, kdy kříženci mají „horší“ vlastnosti než rodiče). Odlišný metabolismus, růst a vývoj rodičovských linií ve srovnání s jejich kříženci je zejména u rostlin běžným jevem (Goff 2011, Fu *et al.* 2014). Nejčastějším projevem heteróze bývá větší velikost kříženců oproti rodičům, představující jak větší akumulaci biomasy, a to již během raných vývojových stádií, tak i větší výnosové parametry v dospělosti (Chen 2013, Schnable *et al.* Springer 2013).

O možných příčinách heteróze dnes existuje mnoho různých hypotéz. Z hlediska „klasické“ genetiky se heteróze neprojevuje a hodnota znaku u křížence se rovná průměru rodičů tehdy, pokud při genové expresi působí pouze aditivní efekty, případně pokud se pozitivní a negativní neaditivní efekty vyrovnají. Jestliže převáží neaditivní efekty, tak je exprese genů (a následně hodnota znaku) vyšší nebo nižší, než je průměr rodičů. Jako nejčastější genetické příčiny heteróze bývají uváděny dominance, superdominance či epistáze projevující se u několika genů společně ovlivňujících určitý znak (Chen 2013, Schnable *et al.* Springer 2013). Molekulárně genetické přístupy mají za to, že se na heterózi může podílet celkově rozdílná genová exprese mezi hybridy a inbreds, při čemž *cis* elementy

(regulační DNA sekvence) a *trans* elementy (proteiny vázající se na *cis* elementy) jsou u kříženců klíčovými faktory odlišné genové exprese (Song *et al.* 2012, Chen 2013). Dále mohou mít vliv na heterózi epigenetické procesy, které regulují stav chromatinu a aktivitu genomu (např. metylace cytozinu v DNA, modifikace histonů, určité aspekty RNA interference). Přirozeně se vyskytující rozdíly v epigenetických mechanismech se mohou předávat přes generace potomků, což může způsobit významnou dědičnou fenotypovou variabilitu. V několika nedávných studiích byla epigenetická variabilita mezi inbredními liniemi a jejich kříženci potvrzena. Může být buď přímo závislá na genetické variabilitě, částečně závislá nebo úplně nezávislá (Shen *et al.* 2012, Groszmann *et al.* 2013, He *et al.* 2013, Chen 2013).

Z morfologického a fyziologického hlediska je heterózní efekt výsledkem několika předpokladů. Jedním z nich je vyšší rychlost buněčného dělení (a s tím související počet buněk), která je založena již ve velmi brzy v embryu. Dalším předpokladem jsou dostatečné energetické zdroje rostliny, závisející především na účinnosti fotosyntézy (Blum 2013). Důležitý podíl na velikosti fotosyntetizující tkáně u kříženců má rychlejší počáteční růst listů, díky kterému se vyvine velká listová plocha pro zachycování světla potřebného k fotosyntéze. Z literatury je známa řada příkladů heteróze ve fotosyntetických charakteristikách (nejčastěji v P_N , ale i v obsahu fotosyntetických pigmentů, aktivitách či obsahu fotosyntetických enzymů či komplexů elektronového transportu, případně strukturních parametrech chloroplastů) (Baer *et al.* 1985, Mehta *et al.* 1992, Holá 1999, Holá *et al.* 1999, 2003, 2007, Ahmadzadeh *et al.* 2004, Kutík *et al.* 2004, Chen *et al.* 2005, Li *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007, Zhu *et al.* 2008, Kočová *et al.* 2009, 2010, Cai *et al.* 2012, Fujimoto *et al.* 2012, Procházková *et al.* 2013, Mohayeji *et al.* 2014).

Projev heteróze se může měnit v závislosti na podmínkách prostředí. Lepší adaptace kříženců na nepříznivé podmínky bývá také uváděna jako jedna z možných příčin pozitivního heterózního efektu (Dahal *et al.* 2012, Chen 2013). V případě heteróze ve fotosyntetických charakteristikách to skutečně bylo prokázáno v několika studiích pocházejících z naší laboratoře i odjinud, především ovšem u rostlin stresovaných nízkou či vysokou teplotou. Kříženci na rozdíl od rodičů jsou často schopni udržet vysokou účinnost fotosyntézy v širším teplotním rozpětí, jak bylo prokázáno např. u čiroku (Blum 1989, Blum *et al.* 1990), bavlny (Zeng *et al.* 2011) či kukuřice (Fracheboud *et al.* 1999, Körnerová *et al.* 1999, Holá *et al.* 2003, Kutík *et al.* 2004, Kočová *et al.* 2009). Mohou být také schopni lepší obnovy poškozeného fotosyntetického aparátu při návratu do optimálních teplot (Holá *et al.* 2007). Je pravděpodobné, že termostabilita různých složek fotosyntetického aparátu je u nich lepší než u jejich rodičovských linií, i když přesné příčiny tohoto zatím nejsou známy.

Heteróze ve fotosyntetických charakteristikách v souvislosti se suchem byla studována méně často, nicméně i zde jsou známy příklady, kdy fotosyntetický aparát kříženců vykazoval lepší odolnost vůči tomuto stresoru než u jejich rodičů. Tak tomu bylo v případě čiroku (Blum *et al.* 1990), slunečnice (Mojayad *et al.* 1994) a částečně (v případě fluorescence Chl) i u kukuřice (Araus *et al.* 2010). Posledně zmiňovaní autoři studovali dospělé rostliny kukuřice pěstované v polních podmínkách. V mém případě však u mladých rostlin kukuřice pěstovaných v nádobových pokusech ve skleníku byla situace odlišná. V kontrolních podmínkách byla heteróze ve fotosyntetických charakteristikách u kříženců jen mírná nebo žádná a někdy i negativní. g_s byla přitom spíše vyšší u kříženců než u rodičů, tudíž rodičovské linie dokázaly využít určitou otevřenost průduchů pro fotosyntézu lépe než kříženci. Potenciál pro fotosyntézu daný vyššími hodnotami g_s tedy u kříženců nemohl být plně využit, jak bylo patrné z relativně nižších hodnot P_N . Z proteomického hlediska bylo u fotosyntetických proteinů za kontrolních podmínek mezi genotypy nalezeno jen několik rozdílů mezi kříženci a rodiči, na rozdíl od nedávné práce Mohayeji *et al.* (2014), kteří v listech hybridní slunečnice pozorovali ve srovnání s rodiči např. zvýšené množství jedné z podjednotek RC PSI, γ podjednotky chloroplastové ATP-syntázy, CA a některých regulačních fotosyntetických proteinů. Pouze obsah LHC proteinů byl – jak již zmíněno výše – v kontrolních podmínkách nižší u genotypu CE704×2023 ve srovnání s genotypem 2023 (a také s reciprokým F1 křížencem 2023×CE704). U mnou studovaných kříženců kukuřice by tedy limitace fotosyntézy mohla být dána relativně nižším množstvím fotosyntetických proteinů vzhledem k fyziologickému potenciálu pro fotosyntézu. Také vzhledem k většímu vzrůstu kříženců a jejich větší spotřebě asimilátů pro tvorbu biomasy by stávající obsah fotosyntetických proteinů mohl být limitující ve srovnání s méně vzrostlými rodiči.

V suboptimálních podmínkách sice byla u kříženců mírná heteróze v morfologických charakteristikách zachována, aktivita fotosyntetických procesů se však pohybovala ještě více pod úrovní rodičovských genotypů. Negativní heterózi ve fotosyntetických charakteristikách bylo možno pozorovat zejména u parametrů P_N , g_s , Φ_{P0} , Φ_{E0} , Ψ_{E0} , Φ_{RE0} . Zvýšená citlivost hybridních genotypů na

stres suchem v tomto ohledu měla zřejmě za následek, že energetické zdroje rostliny nebyly dostatečné pro další rovnoměrný růst rostlin a současně účinnou obrannou reakci vůči stresovým podmínkám. Výsledkem bylo nakonec větší snížení akumulace biomasy ve srovnání s rodiči. Jednou z příčin mnou pozorované odlišné reakce kříženců na stres ve srovnání s rodiči je tedy patrně větší ztráta účinnosti fotosyntézy vzhledem k jejich původním dispozicím k většímu vzrůstu a akumulaci biomasy.

S ohledem na fyziologickou odpověď rostlin na stres suchem a změny listového proteomu je patrné, že genotypy detailně analyzované v mé studii vlivu sucha na mladé rostliny kukuřice se významně lišily ve strategiích, jak se chránit proti poškození způsobenému dehydratací. Příčinné souvislosti stresové reakce rostlin je samozřejmě obtížné odhalit, ale získané výsledky mě vedly k úvaze, že pozorované vnitrodruhové rozdíly v reakci na stres suchem by mohly být spojeny s odlišnou rychlostí udržení/inhibice fotosyntézy v podmínkách sucha a s odlišnou biosyntézou/degradací proteinů podílejících se také především na fotosyntéze. U citlivé rodičovské linie 2023 vedly již mírné stresové podmínky k rychlému uzavření průduchů, což mělo za následek poměrně ranou inhibici fotosyntézy a v důsledku toho zřejmě i proteosyntézy. V pozdějších fázích stresové reakce se to mohlo projevit zejména na úrovni proteosyntézy v chloroplastech. Oproti tomu delší udržování otevřených průduchů a normální fotosyntetické účinnosti u odolnější linie CE704, umožněné pravděpodobně menší velikostí tohoto genotypu a nižším poměrem mezi nadzemní částí a kořeny, bylo spojeno se zachováním aktivní proteosyntézy. Navíc tento genotyp v podmínkách sucha pravděpodobně upřednostňoval primární fotosyntetické procesy spojené s PSI, což mu mohlo přinášet další výhody.

Oba F1 kříženci „doplatili“ v podmínkách sucha na to, že měli od počátku rychlejší růst a vytvořili více biomasy. To pak znamenalo existenci mnohem větší nadzemní části v porovnání s kořeny, která nestačila být dostatečně zásobována vodou/ztrácela více vody než u rodičů. I přes tento společný rys však mezi reciprokými kříženci byly zajímavé rozdíly. Kříženec 2023×CE704 reagoval na stres suchem podobným (byť mnohem výraznějším) způsobem jako jeho mateřská linie 2023, tj. časným uzavřením průduchů a snížením fotosyntézy a proteosyntézy, případně zvýšenou aktivní degradací některých proteinů v reakci na stres. Jak u křížence 2023×CE704, tak u linie 2023 jsem pozorovala pokles hladin zejména fotosyntetických proteinů a proteinů účastnících se regulace genové exprese, přičemž u 2023×CE704 byly větší měrou zasaženy proteiny primární fáze fotosyntézy, u 2023 to byly více enzymy fixace uhlíku. Zásadním způsobem se však tento rozdíl do změny hodnot fotosyntetických parametrů nepromítl.

Z fyziologické reakce křížence CE704×2023 byla také patrná časná reakce v podobě uzavření průduchů a inhibice fotosyntézy jako v případě genotypů 2023 a 2023×CE704. CE704×2023 však již za kontrolních podmínek vykazoval několik rozdílů oproti druhému kříženci, např. o něco menší velikost rostlin, zřejmě s tím spojené nižší hodnoty E, a dále menší množství proteinů světlosběrných antén a naopak více chaperonů a dehydrinů. To by mohlo naznačovat jeho lepší připravenost na stres a menší náchylnost k poškození. V reakci na sucho pak CE704×2023 ve srovnání s druhým křížencem projevil i další znaky související s lepší schopností vyrovnat se s účinkem stresu, např. menší pokles RWC, lepší energetickou konektivitu mezi jednotlivými PSII komplexy a také během sucha „upřednostnil“ větší omezení nadzemní části než kořenů, což značí možnost lepšího zásobení vodou během stresu. Tyto znaky by jistě mohly přispět k pozorovaným menším změnám v proteosyntéze či nižší degradaci proteinů během stresu u tohoto genotypu. Pro udržení dobré funkčnosti fotosyntetického aparátu však nakonec tyto jeho „lepší“ vlastnosti nebyly zřejmě dostatečné.

Pozorované rozdíly mezi reciprokými F1 kříženci je možno vysvětlit několika způsoby. Jednou z možností je matroklinní dědičnost a tudíž projev rozdílné chloroplastové DNA u kříženců v závislosti na mateřském genotypu. Jak už bylo zmíněno výše, u genotypů 2023 a 2023×CE704 došlo v důsledku děletrvajícího sucha ke snížení obsahu chloroplastových ribozomálních proteinů a zároveň i některých dalších proteinů kódovaných chloroplastovou DNA. U genotypů CE704 a CE704×2023 tento pokles pozorován nebyl (s výjimkou proteinu PsbH a jedné izoformy RbcL). To by mohlo svědčit právě ve prospěch mimojaderných genetických vlivů. Rozdíly mezi reciprokými kříženci bylo ale možné pozorovat i u proteinů kódovaných jaderným genomem. V případě proteinů účastnících se primárních fotosyntetických procesů by to mohlo souviset s tím, že všechny komplexy tylakoidních membrán (s výjimkou LHC) jsou složeny z proteinů kódovaných chloroplastovým i jaderným genomem a musí být zajištěna přesná stechiometrie; změny v chloroplastové proteosyntéze by tedy sekundárně mohly ovlivnit i množství proteinů kódovaných v jádře. Dalším vysvětlením by mohla být epigenetická variabilita, která může být na genetické variabilitě úplně nezávislá. Epigeneticky dané

rozdíly v expresi se mohou přenášet z generace na generaci prostřednictvím tzv. rodičovského imprintingu v souvislosti s metylací DNA. Při imprintingu je aktivita určitého genu omezena na jeden chromozóm v závislosti na tom, od kterého rodiče byl zděděn (Groszmann *et al.* 2011, He *et al.* 2013). Ve většině případů to znamená, že pouze maternální nebo paternální alela daného genu je exprimována, kdežto druhá je utlumena. Rozdíly v metylaci DNA tedy mohou mít za následek odlišnou expresi genů, případně expresi různých izoform nebo alelických variant proteinů s různou citlivostí ke stresu. Vzhledem k tomu, že jsem sledovala změny exprese pouze na úrovni proteomu, je nutné počítat ještě s dalšími možnostmi. Neaditivně akumulované proteiny nemusejí nutně znamenat neaditivně exprimované geny, důležitou roli mohou mít regulace i na posttranskripční, posttranslační a degradační úrovni (Chen 2013). Bylo by jistě zajímavé věnovat se studiu rozdílů mezi oběma reciprokými kříženci i na těchto úrovních a pokusit se tak propojit výsledky morfologických, fyziologických, proteomických, epigenetických a dalších „omických“ analýz, aby tak mohly být získány co nejkomplexnější poznatky o této problematice, to je však již úkol pro budoucnost.

Jedním z cílů mé práce bylo také prozkoumat, zda je vhodné použít vybrané fotosyntetické charakteristiky jako sekundární selekční znaky ve šlechtění a selekčních programech zaměřených na vylepšení odolnosti k suchu, zejména pro predikci reakce kříženců na základě reakce jejich rodičů. Využití fyziologických parametrů k tomuto účelu obecně vyžaduje splnění několika kritérií, z nichž hlavními jsou možnost relativně jednoduchého, rychlého a nedestruktivního měření těchto parametrů na mnoha rostlinách/genotypech, dobrá korelace s odolností/citlivostí k cílovému stresovému faktoru a existence vnitrodruhové genetické variability (Brennan *et al.* 2007, Sayar *et al.* 2008). Fotosyntetické parametry hodnocené v mé práci rozhodně splňovaly první kritérium (zejména měření fluorescence Chl a indexů spektrální odrazivosti). Problémem však bylo kritérium druhé, jak se ukázalo např. při hodnocení souboru 25 inbredních linií pěstovaných v kontrolních podmínkách a podmínkách mírného či silnějšího sucha (experimentální celek 3). S produkcí biomasy a především s TOL a SSI indexy udávajícími citlivost/odolnost genotypu k suchu totiž průkazně korelovala jenom P_N . Měření P_N je ale časově náročnější než měření fluorescence Chl či analýzy spektrální odrazivosti nebo absorbance v určitých oblastech spektra, což tento parametr pro šlechtitelskou praxi poněkud znevýhodňuje. Navíc se zřejmě vztahy mezi P_N a produkcí v podmínkách nedostatku vody mohou měnit v závislosti na druhu rostliny – např. u pšenice někteří autoři tento parametr jako sekundární selekční znak při šlechtění genotypů odolných k suchu nedoporučují (Bogale *et al.* 2011, Chen *et al.* 2012), podobně i u vinné révy (Bota *et al.* 2001). Hodně zřejmě záleží i na konkrétních podmínkách pěstování a vývojovém stádiu rostliny, na které sucho působí (Leidi *et al.* 1999), případně na konkrétním složení analyzovaného genotypového souboru – když jsem totiž analyzovala vztah mezi vybranými fotosyntetickými charakteristikami a produkcí suché biomasy v genotypovém souboru 5 inbredních linií a jejich 10 kříženců F1 generace vystavených suchu v kombinaci s vyšší teplotou (experimentální celek 1), vztah mezi P_N a tvorbou sušiny jsem nepotvrdila (našla jsem naopak korelaci s obsahem fotosyntetických pigmentů nebo s maximálním kvantovým výtěžkem primární fotochemie PSII, která u souboru hodnoceném v experimentálním celku 3 průkazná nebyla).

Třetí kritérium, tj. existence vnitrodruhové variability v kontrolních i stresových podmínkách, fotosyntetické parametry opět splňují, což je podloženo jak mými vlastními zjištěními, tak zjištěními jiných autorů (viz. kap. 2.1.2). Avšak k tomu, aby mohl být nějaký znak úspěšně zařazen do šlechtitelského programu, musí mít také dobrou dědivost zejména s ohledem na aditivní složku genetické variance (Sayar *et al.* 2008), tak, aby bylo zajištěno, že vlastnosti rodičů budou alespoň do jisté míry předány do jejich potomstva a projeví se u něj. A v tomto případě mé výsledky opět nebyly příliš povzbudivé. Jak je zmíněno výše, detailní analýza fotosyntetických charakteristik u hybridní kombinace 2023×CE704 ve většině příkladů ukázala, že hodnoty těchto znaků u kříženců jsou spíše pod průměrem rodičů (zejména ve stresových podmínkách) a že zde tedy působí negativní neaditivní genetické efekty. „Dobré“ vlastnosti odolnějšího genotypu CE704 se většinou neodrazily ve vlastnostech F1 kříženců (a to ani u křížence, který měl CE704 jako mateřský genotyp – viz např. záležitosti spojené s lepším fungováním PSI nebo udržování otevřených průduchů) a F1 kříženci naopak projevíli některé vlastnosti, které jejich rodiče neměli nebo u nich nebyly tak výrazné. Také při kvantitativní genetické analýze souboru inbredních linií a jejich F1 kříženců studovaných v prvním experimentálním celku se ukázalo, že neaditivní genetické efekty (dominance, maternální efekty) hrají v dědičnosti fotosyntetických znaků stejnou, nebo dokonce důležitější roli než aditivita. Podobný jev pozorovali u kukuřice např. Oelke *et al.* (1966), Baer *et al.* (1985), Mehta *et al.* (1992), Cai *et al.* (2012) nebo Chohan *et al.* (2012), kteří také analyzovali různé složky genetické variability ve fotosyntetických charakteristikách pomocí metod kvantitativní genetiky. Podíly jednotlivých

genetických efektů na dědičnosti se v mém případě lišily jak v závislosti na sledované charakteristice, tak na konkrétních rodičovských liniích nebo směru křížení. Navíc mé výsledky jasně ukázaly, že genetické efekty podílející se na dědičnosti měřených fotosyntetických parametrů se úplně změnily, když byly rostliny vystaveny suchu. Körnerová *et al.* (1999) a Kočová *et al.* (2009) pozorovaly podobný jev pro aktivity PSI nebo PSII a obsah Chl a Kar u rostlin kukuřice stresovaných chladem. Tyto změny důležitosti jednotlivých typů genetických efektů byly pravděpodobně také hlavní příčinou absence jakékoliv korelace mezi reakcí F1 kříženců na suchu a reakcí jejich rodičů v uvedeném experimentálním celku. Obecná predikce reakce kříženců na stres suchem na základě chování jejich rodičovských linií byla tedy v tomto případě nemožná.

Na základě všech výše uvedených výsledků tedy použití fotosyntetických parametrů v programech zaměřených na šlechtění kukuřice na odolnost k suchu příliš nedoporučuji, alespoň ne při testování mladých rostlin. Pro jednoduchou selekci by sice podle mých zjištění bylo případně možné použít alespoň parametr P_N , ale vzhledem k tomu, že jeho měření je časově přece jenom náročnější než stanovení jiných parametrů, a především vzhledem k tomu, že jeho měření u rodičovských genotypů vystavených vodnímu deficitu neposkytuje informaci o chování jejich potomků vystavených těmto podmínkám, je praktická použitelnost i této charakteristiky relativně malá. Navíc jsou vztahy mezi různými složkami fotosyntetického aparátu (a zároveň i vztahy s dalšími morfologickými, fyziologickými či biochemickými vlastnostmi rostlin) při reakci na suchu zřejmě velmi různorodé a mohou se dosti výrazně lišit mezi různými genotypy (a to i mezi genotypy blízce příbuznými – rodiči a jejich kříženci). I přes tento nepřilíš optimistický závěr se však domnívám, že moje práce přispěla k o něco lepšímu porozumění procesům, kterými rostliny na suchu reagují, a možných příčin odolnosti/citlivosti k tomuto stresovému faktoru.

6. Souhrn

Možné mechanismy odolnosti rostlin k suchu související zejména s fotosyntetickými procesy byly zkoumány na základě porovnání celkové reakce mladých rostlin inbredních linií kukuřice s reakcí jejich F1 kříženců na mírný (šestidenní) a silnější (desetidenní) stres suchem. Detailní analýza změn listového proteomu byla provedena u kontrastních genotypů (inbredních rodičovských linií 2023 a CE704 a obou jejich reciprokých kříženců 2023×CE704 a CE704×2023), vybraných na základě předcházející analýzy citlivosti/odolnosti k suchu ve větších genotypových souborech.

Delší perioda stresu suchem měla na rostliny podle očekávání negativnější účinek než kratší perioda, což bylo zřejmé nejen ze změn morfologických i fyziologických charakteristik, ale i z analýzy změn v množství listových proteinů.

Nejzastoupenější funkční kategorií proteinů akumulujících se během dehydratace byly chaperony a příbuzné proteiny, výrazně se zvýšila i hladina dehydrinů. Proteiny, u nichž došlo v důsledku sucha k největšímu snížení obsahu, byly v případě krátkodobého stresu relativně různorodé, ale při prodloužení stresu ve většině případů patřily do kategorie proteinů primárních fotosyntetických procesů a metabolismu sacharidů včetně enzymů fotosyntetické fixace uhlíku.

Studované genotypy vykazovaly odlišné strategie, jak se vyrovnat s nedostatkem vody. Strategie odolnějšího genotypu CE704 byla založená na schopnosti ponechat při suchu delší dobu otevřené průduchy a udržet tak účinnost fotosyntézy na vysoké úrovni, což zřejmě souviselo s jeho celkově menším vzrůstem a menším poměrem nadzemní část/kořeny v porovnání s citlivým genotypem 2023. Genotyp CE704 navíc pravděpodobně v podmínkách sucha upřednostňoval primární fotosyntetické procesy spojené s PSI. Proteomická analýza odhalila souvislost zachování účinnosti fotosyntézy s aktivovanou proteosyntézou při mírném stresu suchem. Naopak genotyp 2023, který upřednostnil časné uzavření průduchů vedoucí k menším ztrátám vody z listů, vykazoval snížení fotosyntetické účinnosti i nižší akumulaci proteinů.

Kříženec 2023×CE704 reagoval na stres suchem podobným způsobem jako jeho mateřská linie 2023, tj. časným uzavřením průduchů a omezením fotosyntézy a proteosyntézy (zejména úbytkem chloroplastových ribozomálních proteinů a proteinů podílejících se na fotosyntetických procesech). U reciprokého křížence CE704×2023 naopak nebyl zaznamenán téměř žádný pokles hladiny proteinů v důsledku stresu. Tento kříženec již za kontrolních podmínek vykazoval některé vlastnosti naznačující možnou lepší připravenost na stres a menší náchylnost k poškození. Při působení sucha projevil další znaky, které mohly přispět k pozorovaným menším změnám v množství proteinů. Pro udržení dobré funkčnosti fotosyntetického aparátu však nakonec tyto jeho „lepší“ vlastnosti nebyly zřejmě dostatečné.

V řadě případů byla reakce kříženců na suchu negativnější než reakce jejich rodičovských genotypů. Jednou z příčin pozorované odlišné reakce kříženců na stres ve srovnání s rodiči byla patrně větší ztráta účinnosti fotosyntézy vzhledem k jejich původním lepším dispozicím pro větší a rychlejší růst a akumulaci biomasy. Byl zde také zřejmý důležitý vliv mateřského genotypu.

Fotosyntetické charakteristiky nevykazovaly vždy dobrou korelaci s odolností/citlivostí genotypu k suchu. Korelace fotosyntetických parametrů s produkcí biomasy značící citlivost/odolnost genotypu k suchu závisela na konkrétních podmínkách pěstování, případně i na konkrétním složení analyzovaného genotypového souboru.

Fotosyntetické charakteristiky měřené u inbredních linií nebylo možné využít k predikci chování jejich kříženců. Kvantitativní genetická analýza souboru inbredních linií a jejich F1 kříženců ukázala, že neaditivní genetické efekty (dominance, maternální efekty) hrají v dědičnosti fotosyntetických znaků stejnou nebo dokonce důležitější roli než aditivita. Podíly jednotlivých genetických efektů na dědičnosti analyzovaných charakteristik se lišily jak v závislosti na sledované charakteristice, tak na konkrétních rodičovských liniích nebo směru křížení a měnily se při působení stresových podmínek.

7. Seznam použité literatury

- Abdeen A., Schnell J., Miki B. (2012). Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor *ABF3*. *BMC Genomics* **11**: 69.
- Abebe T., Guenzi A.C., Martin B., Cushman J.C. (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* **131**: 1748-1755.
- Abedi T., Pakniyat H. (2010). Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech J. Genet. Plant Breed.* **46**: 27-34.
- Abreu I.A., Farinha A.P., Negrão S., Gonçalves N., Fonseca C., Rodrigues M., Batista R., Saibo N.J.M., Oliveira M.M. (2013). Coping with abiotic stress: proteome changes for crop improvement. *J. Proteomics* **93**: 145-168.
- Acar O., Türkan I., Özdemir F. (2001). Superoxide dismutase and peroxidase activities in drought sensitive and resistant barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. *Acta Physiol. Plant.* **23**: 351-356.
- Agoston B.S., Kovács D., Tompa P., Perczel A. (2011). Full backbone assignment and dynamics of the intrinsically disordered dehydrin ERD14. *Biomol. NMR Assign.* **5**: 189-193.
- Agrawal G.K., Sarkar A., Righetti P.G., Pedreschi R., Carpentier S., Wang T., Barkla B.J., Kohli A., Ndimba B.K., Bykova N.V., Rampitsch C., Zolla L., Rafudeen M.S., Cramer R., Bindschleder L.V., Tsakirpaloglou N., Ndimba R.J., Farrant J.M., Renaut J., Job D., Kikuchi S., Rakwal R. (2013). A decade of plant proteomics and mass spectrometry: translation of technical advancements to food security and safety issues. *Mass Spectr. Rev.* **32**: 335-365.
- Ahmad P., Jaleel C.A., Salem M.A., Nabi G., Sharma S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Crit. Rev. Biotechnol.* **30**: 161-175.
- Ahmad R., Ahnadh N., Pervez M.A. (1998). Canopy temperature: a potential technique for evaluating genetic response to drought in crop plants. *Pak. J. Biol. Sci.* **1**: 142-144.
- Ahmadzadeh A., Lee E.A., Tollenaar M. (2004). Heterosis for leaf CO₂ exchange rate during the grain-filling period in maize. *Crop Sci.* **44**: 2095-2100.
- Akashi K., Yoshida K., Kuwano M., Kajikawa M., Yoshimura K., Hoshiyasu S., Inagaki N., Yokota A. (2011). Dynamic changes in the leaf proteome of a C3 xerophyte, *Citrullus lanatus* (wild watermelon), in response to water deficit. *Planta* **233**: 947-960.
- Alam I., Sharmin S.A., Kim K.H., Yang J.K., Choi M.S., Lee B.H. (2010). Proteome analysis of soybean roots subjected to short-term drought stress. *Plant Soil* **333**: 491-505.
- Ali G.M., Komatsu S. (2006). Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *J. Proteome Res.* **5**: 396-403.
- Ali M.A., Niaz S., Abbas A., Sabir W., Jabran K. (2009). Genetic diversity and assessment of drought tolerant sorghum landraces based on morph-physiological traits at different growth stages. *Plant OMICS* **2**: 214-227.
- Alvarez S., Berla B.M., Sheffield J., Cahoon R.E., Jez J.M., Hicks L.M. (2009). Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics* **9**: 2419-2431.
- Alvarez S., Choudhury S.R., Pandey S. (2014). Comparative quantitative proteomics analysis of the ABA response of roots of drought-sensitive and drought-tolerant wheat varieties identifies proteomic signatures of drought adaptability. *J. Proteome Res.* **13**: 1688-1701.
- Alvarez S., Marsh E.L., Schroeder S.G., Schachtman D.P. (2008). Metabolomic and proteomic changes in the xylem sap of maize under drought. *Plant Cell Environ.* **31**: 325-340.
- Anderson J.M. (1992). Cytochrome *b₆/f* complex: dynamic molecular organization, function and acclimation. *Photosynth. Res.* **34**: 341-357.
- Aranjuelo I., Molero G., Erice G., Avice J.C., Nogués S. (2011). Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **62**: 111-123.
- Araus J.L., Amaro T., Voltas J., Nakkoul H., Nachit M.M. (1998). Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Field Crop. Res.* **55**: 209-223.
- Araus J.L., Sánchez C., Cabrera-Bosquet L. (2010). Is heterosis in maize mediated through better water use? *New Phytol.* **187**: 392-406.
- Araus J.L., Serret M.D., Edmeades G.O. (2012). Phenotyping maize for adaptation to drought. *Front. Physiol.* **3**: Article 305.
- Araus J.L., Slafer G.A., Reynolds M.P., Royo C. (2002). Plant breeding and water relations in C3 cereals: what should we breed for? *Ann. Bot.* **89**: 925-940.
- Arbona V., Manzi M., de Ollas C., Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 4885-4911.
- Arjenaki F.G., Jabbari R., Morshedi A. (2012). Evaluation of drought stress on relative water content, chlorophyll content and mineral elements of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Int. J. Agric. Crop Sci.* **4**: 726-729.
- Armstead I., Huang L., Ravagnani A., Robson P., Ougham H. (2009). Bioinformatics in orphan crops. *Brief. Bioinform.* **10**: 645-653.
- Arora A., Sairam R.K., Srivastava G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Curr. Sci.* **82**: 1227-1238.
- Arunyanark A., Jogloy S., Akkasaeng C., Vorasoot N., Kesmala T., Nageswara Rao R.C., Wright G.C., Patanothai A. (2008). Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut. *J. Agron. Crop Sci.* **194**: 113-125.
- Arunyanark A., Jogloy S., Vorasoot N., Akkasaeng C., Kesmala T., Patanoth A.I. (2009). Stability of relationship between chlorophyll density and soil plant analysis development. Chlorophyll meter readings in peanut across different drought stress conditions. *Asian J. Plant Sci.* **8**: 102-110.
- Ashoub A., Beckhaus T., Berberich T., Karas M., Brüggeman W. (2013). Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. *Planta* **237**: 771-781.
- Ashraf M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnol. Adv.* **28**: 169-183.
- Ashraf M., Foolad M.R. (2007). Roles of glycinebetaine and proline in improving plant abiotic stress tolerance. *Environ. Exp. Bot.* **59**: 206-216.

- Athar H.R., Ashraf M. (2009). Strategies for crop improvement against salinity and drought stress: an overview. In: Ashraf M., Ozturk M., Athar H.R. (eds.): *Salinity and Water Stress. Improving Crop Efficiency*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 1-16.
- Atkin O.K., Macherel D. (2009). The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann. Bot.* **103**: 581-597.
- Azevedo R.A., Lea P.J. (2011). Research on abiotic and biotic stress – what next? *Ann. Appl. Biol.* **159**: 317-319.
- Babar M.A., van Ginkel M., Klatt A.R., Prasad B., Reynolds M.P. (2006). The potential of using spectral reflectance indices to estimate yield in wheat grown under reduced irrigation. *Euphytica* **150**: 155-172.
- Bacana M., Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I. (1998). Iron dependent oxygen free radical generation in plants subjected to environmental stresses: toxicity and antioxidants. *Plant Soil* **201**:137-147.
- Baer, G.R., Schrader, L.E. (1985). Inheritance of DNA concentration, and cellular contents of soluble protein, chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase, and pyruvate, Pi dikinase activity in maize leaves. *Crop Sci.* **25**: 916-923.
- Baginsky S. (2009). Plant proteomics: concepts, applications, and novel strategies for data interpretation. *Mass Spectr. Rev.* **28**: 93-120.
- Bajji M., Kinet J.-M., Lutts S. (2002). The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* **36**: 61-70.
- Baker N.R. (2008). Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 89-113.
- Baker N.R., Rosenqvist E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: and examination of future possibilities. *J. Exp. Bot.* **55**: 1607-1621.
- Baloch M.J., Khan N.U., Jatoti W.A., Hassan G., Khakhwani A.A., Soomro Z.A., Veesar N.F. (2011). Drought tolerance studies through WSSI and stomata in upland cotton. *Pak. J. Bot.* **43**: 2479-2484.
- Balota M., Payne W.A., Evett S.R., Lazar M.D. (2007). Canopy temperature depression sampling to assess grain yield and genotypic differentiation in winter wheat. *Crop Sci.* **47**: 1518-1529.
- Balouchi H.R. (2010). Screening wheat parents of mapping population for heat and drought tolerance, detection of wheat genetic variation. *World Acad. Sci. Engin. Technol.* **42**: 210-220.
- Barbagallo R.P., Oxborough K., Pallett K.E., Baker N.R. (2003). Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiol.* **132**: 485-493.
- Barber J., Morris E., Büchel C. (2000). Revealing the structure of the photosystem II chlorophyll binding proteins, CP43 and CP47. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1459**: 239-247.
- Barkla B.J., Vera-Estrella R., Pantoja O. (1975). Progress and challenges for abiotic stress proteomics of crop plants. *Proteomics* **13**: 1801-1815.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**: 205-207.
- Baum G., Chen Y., Arazi T., Takatsuji H., Fromm H. (1993). A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. *J. Biol. Chem.* **268**: 19610-19617.
- Bazargani M.M., Sarhadi E., Bushehri A.A.S., Matros A., Mock H.P., Naghavi M.R., Hajihoseini V., Mardi M., Hajirezai M.R., Moradi F., Ehdaie B., Salekdeh G.H. (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *J. Proteomics* **74**: 1959-1973.
- Bäzinger M., Auras J.L. (2007). Recent advances in breeding maize for drought and salinity stress tolerance. In: Jenks M.A., Hasegava P.M., Jain S.M. (eds.): *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 587-601.
- Bäzinger M., Edmeades G.O., Beck D., Bellon M. (2000). Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: from theory to practice. CIMMYT, Mexico, D.F.
- Bedon F., Villar E., Vincent D., Dupuy J.W., Lomenech A.M., Mabialangoma A., Chaumeil P., Barré A., Plomion C., Gion J.M. (2012). Proteomic plasticity of two *Eucalyptus* genotypes under contrasted water regimes in the field. *Plant Cell Environ.* **35**: 790-805.
- Bell E., Mullet J.E. (1991). Lipxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding, and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 456-462.
- Benešová M. (2006). Adaptace fotosyntetického aparátu inbredních a hybridních genotypů kukuřice na změny teplotního režimu. *Diplomová práce*, Přírodovědecká fakulta UK v Praze.
- Bergantino E., Brunetta A., Touloupakis E., Segalla A., Szabó I., Giacometti G.M. (2003). Role of the PSII-H subunit in photoprotection: novel aspects of D1 turnover in *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* **278**: 41820-41829.
- Betrán J.F., Ribaut J.M., Beck D.L., de Leon D.G. (2003). Genetic analysis of inbred and hybrid grain yield under stress and non stress environments in tropical maize. *Crop Sci.* **43**: 807-817.
- Binschedler L.V., Cramer R. (2011). Quantitative plant proteomics. *Proteomics* **11**: 756-775.
- Blum A. (1989). The temperature response of gas exchange in sorghum leaves and the effect of heterosis. *J. Exp. Bot.* **40**: 453-460.
- Blum A. (2005). Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential – are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust. J. Agric. Res.* **56**: 1159-1168.
- Blum A. (2009). Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress. *Field Crop. Res.* **112**: 119-123.
- Blum A. (2013). Heterosis, stress, and the environment: a possible road map towards the general improvement of crop yield. *J. Exp. Bot.* **64**: 4829-4837.
- Blum A., Ramaiah S., Kanemasu E.T., Paulsen G.M. (1990). The physiology of heterosis in sorghum with respect to environmental stress. *Ann. Bot.* **65**: 149-158.
- Blum A., Shipler L., Golan G., Mayer J. (1989). Yield stability and canopy temperature of wheat genotypes under drought stress. *Field Crop. Res.* **22**: 289-296.
- Blum H., Beier H., Gross H. (1987). Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

- Bogale A., Tesfaye K., Geleto T. (2011). Morphological and physiological attributes associated to drought tolerance of Ethiopian durum wheat genotypes under water deficit condition. *J. Biodiv. Environ. Sci.* **1**: 22-36.
- Bogeat-Triboulot M.B., Brosche M., Renaut J., Jouve L., Le Thiec D., Fayyaz P. (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiol.* **143**: 876-892.
- Bohler S., Sergeant K., Jolivet Y., Hoffmann L., Hausman J.F., Dizengremel P., Renaut J. (2013). A physiological and proteomic study of poplar leaves during ozone exposure combined with mild drought. *Proteomics* **13**: 1737-1754.
- Bohnert H.J., Gong Q., Li P., Ma S. (2006). Unraveling abiotic stress tolerance mechanisms – getting genomics going. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 180-188.
- Bolaños J., Edmeades G.O. (1993). Eight cycles of selection for water stress tolerance in lowland tropical maize. I. Responses in grain yield, biomass and radiation utilization. *Field Crop. Res.* **31**: 233-252.
- Bolaños J., Edmeades G.O. (1996). The importance of the anthesis-silking interval in breeding for water stress tolerance in tropical maize. *Field Crop. Res.* **48**: 65-80.
- Bonhomme L., Monclus R., Vincent D., Carpin S., Claverol S., Lomench A.-M., Labas V., Plomion C., Brignolas F., Morabito D. (2009a). Genetic variation and drought response in two *Populus × euramericana* genotypes through 2-DE proteomic analysis of leaves from field and glasshouse cultivated plants. *Phytochemistry* **70**: 988-1002.
- Bonhomme L., Monclus R., Vincent D., Carpin S., Lomench A.-M., Plomion C., Brignolas F., Morabito D. (2009b). Leaf proteome analysis of eight *Populus × euramericana* genotypes: genetic variation in drought response and in water-use efficiency involves photosynthesis-related proteins. *Proteomics* **9**: 4121-4142.
- Bota J., Flexas J., Medrano H. (2001). Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. *Ann. Appl. Biol.* **138**: 353-361.
- Boureima S., Oukarroum A., Diouf M., Cisse N., VanDamme P. (2012). Screening for drought tolerance in mutant germplasm of sesame (*Sesamum indicum*) probing by chlorophyll *a* fluorescence. *Environ. Exp. Bot.* **81**: 37-43.
- Bouslama M., Schapaugh W.T. (1984). Stress tolerance in soybean. Part 1: Evaluation of three screening techniques for heat and drought tolerance. *Crop Sci.* **24**: 933-937.
- Bravdo B., Pallas J.E., Jr. (1982). Photosynthesis, photorespiration and RuBP carboxylase/oxygenase activity in selected peanut genotypes. *Photosynthetica* **16**: 36-42.
- Bray E.A. (2007). Molecular and physiological responses to water-deficit stress. In: Jenks M.A., Hasegawa P.M., Jain S.M. (eds): *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, Springer, Dordrecht, pp. 121-140.
- Brennan J.P., Condon A.G., van Ginkel M., Reynolds M.P. (2007). An economic assessment of the use of physiological selection for stomatal aperture-related traits in the CIMMYT breeding program. *J. Agric. Sci.* **145**: 187-194.
- Brennan J.P., Martin P.J. (2007). Returns to investment in new breeding technologies. *Euphytica* **157**: 337-349.
- Brestič M., Živčák M. (2013). PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: Rout G.R., Das A.B. (eds.): *Molecular Stress Physiology of Plants*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 87-131.
- Bruce W.B., Edmeades G.O., Barker T.C. (2002). Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *J. Exp. Bot.* **53**: 13-25.
- Budak H., Akpinar B.A., Unver T., Turktas M. (2013). Proteome changes in wild and modern wheat leaves upon drought stress by two-dimensional electrophoresis and nanoLC-ESI-MS/MS. *Plant Mol. Biol.* **83**: 89-103.
- Busch A., Hippler M. (2011). The structure and function of eukaryotic photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* **1807**: 864-877.
- Cabello J.V., Loydero A.F., Zurbriggen M.D. (2014). Novel perspectives for the engineering of abiotic stress tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **26**: 62-70.
- Cabrera-Bosquet L., Crossa J., von Zitzewitz J., Serret M.D., Araus J.L. (2012). High-throughput phenotyping and genomic selection: the frontiers of crop breeding converge. *J. Integr. Plant Biol.* **54**: 312-320.
- Cai Q.S., Wang L.L., Yao W.H., Zhang Y.D., Liu L., Yu L.J., Fan X.M. (2012). Diallel analysis of photosynthetic traits in maize. *Crop Sci.* **52**: 551-559.
- Camp P.J., Huber S.C., Burke J.J., Moreland D.E. (1982). Biochemical changes that occur during senescence of wheat leaves. I. Basis for the reduction of photosynthesis. *Plant Physiol.* **70**: 1641-1646.
- Campos H., Cooper M., Habben J.E., Edmeades G.O., Schussler J.R. (2004). Improving drought tolerance in maize: a view from industry. *Field Crop. Res.* **90**: 19-34.
- Capell T., Bassie L., Christou P. (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 9909-9914.
- Caruso G., Cavaliere C., Foglia P., Gubbiotti R., Samperi R., Laganà A. (2009). Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Sci.* **177**: 570-576.
- Castillejo M.A., Maldonado A.M., Ogueta S., Jorri J.V. (2008). Proteomic analysis of responses to drought stress in sunflower (*Helianthus annuus*) leaves by 2DE gel electrophoresis and mass spectrometry. *Open Proteomics J.* **1**: 59-71.
- Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.N., Francia E., Marè C., Tondelli A., Stanca A.M. (2008). Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crop. Res.* **105**: 1-14.
- Cellier F., Conéjéro G., Bretiler J.C., Casse F. (1998). Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Accumulation of dehydrin transcripts correlates with tolerance. *Plant Physiol.* **116**: 319-328.
- Cia M.C., Guimarães A.C.R., Medici L.O., Chabregas S.M., Azevedo R.A. (2012). Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. *Ann. Appl. Biol.* **161**: 313-324.
- Close T.J. (2006). Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.* **100**: 291-296.
- Coleman J.R. (2000). Carbonic anhydrase and its role in photosynthesis. In: Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. (eds.): *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (Advances in Photosynthesis, Vol. 9). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 353-367.

- Cominelli E., Conti L., Tonelli C., Galbiati M. (2013). Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnol.* **30**: 355-361.
- Condon A.G., Reynolds M.P., Brennan J., van Ginkel M., Trethowan R., Rebetzke R.J., Bonnett D.G., Richards R.A., Farquhar G.D. (2008). Stomatal aperture related traits and yield potential in bread wheat. In: Reynolds M.P., Pietragalla J., Braun H.J. (eds.): International Symposium on Wheat Yield Potential: Challenges to International Wheat Breeding. CIMMYT, Mexico.
- Cornic G., Fresneau C. (2002). Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Ann. Bot.* **89**: 887-894.
- Cortina C. Culiañez M.F. (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.* **169**: 75-82.
- Costa J.M., Grant O.M., Chaves M.M. (2013). Thermography to explore plant-environment interactions. *J. Exp. Bot.* **64**: 3937-3949.
- Cramer G.R., van Sluyter S.C., Hopper D.W., Pascovici D., Keighley T., Haynes P.A. (2013). Proteomic analysis indicates massive changes in metabolism prior to the inhibition of growth and photosynthesis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to water deficit. *BMC Plant Biol.* **13**: 49.
- Dahal D., Mooney B.P., Newton K.J. (2012). Specific changes in total and mitochondrial proteomes are associated with higher levels of heterosis in maize hybrids. *Plant J.* **72**: 70-83.
- DaMatta F. M. (2004). Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazil. J. Plant Physiol.* **16**: 1-6.
- Daszkowska-Golec A., Szarejko I. (2013). Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front. Plant Sci.* **4**: 138.
- Davies W.J., Zhang J., Yang J., Dodd I.C. (2011). Novel crop science to improve yield and resource use efficiency in water-limited agriculture. *J. Agric. Sci.* **149**: 123-131.
- De Almeida Silva M., Jifon J.L., da Silva J.A.G., Sharma V. (2007). Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Braz. J. Plant Physiol.* **19**: 193-201.
- De Almeida Silva M., Jifon J.L., Sharma V., da Silva J.A.G., Caputo M.M., Damaj M.B., Guimarães E.R., Ferro M.I.T. (2011). Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes. *Sugar Technol.* **13**: 191-197.
- De Ronde J.A., Laurie R.N., Caetano T., Greyling M.M., Kerepesi I. (2004). Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. *Euphytica* **138**: 123-132.
- De Souza G.J., da Silva J.V. (1987). Partitioning of carbohydrates in annual and perennial cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Exp. Bot.* **38**: 1211-1218.
- Deeba F., Pandey A.K., Ranjan S., Mishra A., Singh R., Sharma Y.K., Shirke P.A., Pandey V. (2012). Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* **53**: 6-18.
- Degenkolbe T., Do P.T., Kopka J., Zuther E., Hinch D.K., Köhl K.I. (2013). Identification of drought tolerance markers in a diverse population of rice cultivars by expression and metabolite profiling. *PLoS ONE* **8**: e63637.
- Deikman J., Petracek M., Heard J.E. (2012). Drought tolerance through biotechnology: improving translation from the laboratory to farmers' fields. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**: 243-250.
- Denčić S., Kastori R., Kobiljski B., Duggan B. (2000). Evaluation of grain yield and its components in wheat cultivars and landraces under near optimal and drought conditions. *Euphytica* **113**: 43-52.
- Ding Y., Tao Y., Zhu C. (2013). Emerging roles of microRNAs in the mediation of drought stress response in plants. *J. Exp. Bot.* **64**: 3077-3086.
- Douce R., Heldt H.W. (2000). Photorespiration. In: Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. (eds.): Photosynthesis: Physiology and Metabolism (Advances in Photosynthesis, Vol. 9). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 115-136.
- Du Y.C., Kawamitsu Y., Nose A., Hiyane S., Murayama S., Wasano K., Uchida Y. (1996). Effects of water stress on carbon exchange rate and activities of photosynthetic enzymes in leaves of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Aust. J. Plant Physiol.* **23**: 719-726.
- Durand T.C., Sergeant K., Renaut J., Planchon S., Hoffmann L., Carpin S., Label P., Morabito D., Hausman J.F. (2011). Poplar under drought: comparison of leaf and cambial proteomic responses. *J. Proteomics* **74**: 1396-1410.
- Eberhart S.A., Gardner C.O. (1966). A general model for genetic effects. *Biometrics* **22**: 864-881.
- Ebrahimiyan M., Majidi M.M., Mirlohi A., Noroozi A. (2013). Physiological traits related to drought tolerance in tall fescue. *Euphytica* **190**: 401-414.
- Echevarría-Zomeño S., Ariza D., Jorge I., Lenz C., Del Campo A., Jorrín J. V., Navarro R. M. (2009). Changes in the protein profile of *Quercus ilex* leaves in response to drought stress and recovery. *J. Plant Physiol.* **166**: 233-245.
- El-Aneel A., Cohen A., Banoub J. (2009). Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl. Spectr. Rev.* **44**: 210-230.
- Elham F., Khavari-Nejad R.A., Salekdeh G.H., Najafi F. (2012). Evaluation of cuticular wax deposition, stomata and carbohydrate of wheat leaves for screening drought tolerance. *Adv. Environ. Biol.* **6**: 4035-4040.
- El-Sharkawy M.A., Lopez Y., Bernal L.M. (2008). Genotypic variation in activities of phosphoenolpyruvate carboxylase and correlations with leaf photosynthetic characteristics and crop productivity of cassava grown in low-land seasonally-dry tropics. *Photosynthetica* **46**: 238-347.
- Faraloni C., Cutino I., Petrucelli R., Leva A.R., Lazzeri S., Torzillo G. (2011). Chlorophyll fluorescence technique as a rapid tool for *in vitro* screening of olive cultivars (*Olea europaea* L.) tolerant to drought stress. *Environ. Exp. Bot.* **73**: 49-56.
- Farkas D., Franzén L.G., Hansson Ö. (2011). Cloning, expression and purification of the luminal domain of spinach photosystem I subunit PsfA functional in binding to plastocyanin and with a disulfide bridge required for folding. *Protein Express. Purif.* **78**: 156-166.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S.M.A. (2009). Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* **29**: 185-212.
- Farquhar G.D., O'Leary M.H., Berry J.A. (1982). On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**: 121-137.

- Farquhar G.D., von Caemmerer S., Berry J.A. (1980). A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**: 78-90.
- Farshadfar E., Elyasi P., Hasheminasab H. (2013). Incorporation of agronomic and physiological indicators of drought tolerance in a single integrated selection index for screening drought tolerant landraces of bread wheat genotypes. *Int. J. Agron. Plant Product.* **4**: 3314-3325.
- Fazeli F., Ghorbanli M., Niknam V. (2007). Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biol. Plant.* **51**: 98-103.
- Fedoroff N.V. (2002). RNA-binding proteins in plants: the tip of an iceberg? *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 452-459.
- Fensholt R., Sandholt I. (2003). Derivation of a shortwave infrared water stress index from MODIS near- and shortwave infrared data in a semiarid environment. *Remote Sens. Environ.* **87**: 111-121.
- Fernandez G.C.J. (1992). Effective selection criteria for assessing stress tolerance. In: Kuo C.G. (ed.): Proceedings of the International Symposium on Adaptation of Vegetables and Other Food Crops in Temperature and Water Stress, Tainan, Taiwan.
- Fernie A.R., Schauer N. (2009). Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? *Trends Genet.* **25**: 39-48.
- Fiorrani F., Schurr U. (2013). Future scenarios for plant phenotyping. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 267-291.
- Fisher R.A., Maurer R. (1978). Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield responses. *Aust. J. Agric. Res.* **29**: 897-912.
- Fischer K.S., Fukai S., Kumar A., Leung H., Jongdee B. (2012). Field phenotyping strategies and breeding for adaptation of rice to drought. *Front. Physiol.* **3**: 282.
- Fischer N., Hippler M., Sétif P., Jacquot J.P., Rochaix J. D. (1998). The PsaC subunit of photosystem I provides an essential lysine residue for fast electron transfer to ferredoxin. *EMBO J.* **17**: 849-858.
- Flexas J., Bota J., Galmés J., Medrano H., Ribas-Carbó M. (2006a). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol. Plant.* **127**: 343-352.
- Flexas J., Diaz-Espejo A., Berry J.A., Cifre J., Galmés J., Kaldenhoff R., Medrano H., Ribas-Carbó M. (2007). Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *J. Exp. Bot.* **58**: 1533-1543.
- Flexas J., Niinemets Ü., Galle A., Barbour M.M., Centritto M., Diaz-Espejo A., Douthe C., Galmés J., Ribas-Carbó M., Rodriguez P.L., Rosseló F., Soolanayakanahally R., Tomas M., Wright I.J., Farquhar G.D., Medrano H. (2013). Diffusional conductances to CO₂ as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water-use efficiency. *Photosynth. Res.* **117**: 45-59.
- Flexas J., Ribas-Carbó M., Bota J., Galmés J., Henkle M., Martínez-Cañellas S., Medrano H. (2006b). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytol.* **172**: 73-82.
- Ford K.L., Cassin A., Bacic A. (2011). Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with different drought stress tolerance. *Front. Plant Sci.* **2**: 44.
- Fracheboud Y., Haldimann P., Leipner J., Stamp P. (1999). Chlorophyll fluorescence as a selection tool for cold tolerance of photosynthesis in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* **50**: 1533-1540.
- Franck F., Juneau P., Popovic R. (2002). Resolution of the Photosystem I and Photosystem II contributions to chlorophyll fluorescence of intact leaves at room temperature. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1556**: 239-246.
- Fu D., Xiao M., Hayward A., Fu Y., Liu G., Jiang G., Zhang H. (2014). Utilization of crop heterosis: a review. *Euphytica* **197**: 161-173.
- Fujimoto R., Taylor J.M., Shirasawa S., Peacock W.J., Dennis E.S. (2012). Heterosis of *Arabidopsis* hybrids between C24 and Col is associated with increased photosynthesis capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**: 7109-7114.
- Fulda S., Mikkat S., Stegmann H., Horn R. (2011). Physiology and proteomics of drought stress acclimation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Biol.* **13**: 632-642.
- Furbank R.T., Hatch M.D., Jenkins C.L.D. (2000). C4 photosynthesis: mechanism and regulation. In: Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. (eds.): Photosynthesis: Physiology and Metabolism (Advances in Photosynthesis, Vol. 9). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 435-457.
- Furbank R.T., Tester M. (2011). Phenomics – technologies to relieve the phenotyping bottleneck. *Trends Plant Sci.* **16**: 635-644.
- Gamon J.A., Peñuelas J., Field C.B. (1992). A narrow-waveband spectral index that tracks diurnal changes in photosynthetic efficiency. *Remote Sens. Environ.* **41**: 35-44.
- Gao B. (1996). NDWI – a normalized difference water index for remote sensing of vegetation liquid water from space. *Remote Sens. Environ.* **58**: 257-266.
- Gardner B.R., Blad B.L., Wilson G.D. (1986). Characterizing corn hybrid moisture stress sensitivity using canopy temperature measurements. *Remote Sens. Environ.* **19**: 207-211.
- Gazanchian A., Hajheidari M., Sima N.K., Salekdeh G.H. (2007). Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *J. Exp. Bot.* **58**: 291-300.
- Ge P., Ma C., Wang S., Gao L., Li X., Guo G., Ma W., Yan Y. (2012). Comparative proteomic analysis of grain development in two spring wheat varieties under drought stress. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**: 1297-1313.
- Geravandi M., Farshadfar E., Kahrizi D. (2011). Evaluation of some physiological traits as indicators of drought tolerance in bread wheat genotypes. *Russ. J. Plant Physiol.* **58**: 69-75.
- Ghabooli M., Khatabi B., Ahmadi F.S., Sepehri M., Mirzaei M., Amirkhani A., Jorrín-Novo J.V., Salekdeh G.H. (2013). Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *J. Proteomics* **94**: 289-301.
- Ghannoum O. (2009). C₄ photosynthesis and water stress. *Ann. Bot.* **103**: 635-2009.
- Gilbert M.E., Zwieniecki M., Holbrook N.M. (2011). Independent variation in photosynthetic capacity and stomatal conductance leads to differences in intrinsic water use efficiency in 11 soybean genotypes before and during mild drought. *J. Exp. Bot.* **62**: 2875-2887.

- Gill S.S., Tuteja N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance of crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 909-930.
- Gil-Quintana E., Larrainzar E., Seminario A., Díaz-Leal J.L., Alamillo J.M., Pineda M., Arrese-Igor C., Wienkoop S., González E.M. (2013). Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. *J. Exp. Bot.* **64**: 2171-2182.
- Gitelson A.A., Gritz Y., Merzlyak M.N. (2003). Relationships between leaf chlorophyll content and spectral reflectance and algorithms for non-destructive chlorophyll assessment in higher plant leaves. *J. Plant Physiol.* **160**: 271-282.
- Goff S.A. (2011). A unifying theory for general multigenic heterosis: energy efficiency, protein metabolism, and implications for molecular breeding. *New Phytol.* **189**: 923-937.
- Gollack D., Lüking I., Yang O. (2011). Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep.* **30**: 1383-1391.
- González J.A., Bruno M., Valoy M., Prado F.E. (2011). Genotypic variation in gas exchange parameters and leaf stable carbon and nitrogen isotopes in ten quinoa cultivars grown under drought. *J. Agron. Crop Sci.* **197**: 81-93.
- Gorbe E., Calatayud A. (2012). Applications of chlorophyll fluorescence imaging technique in horticultural research: a review. *Sci. Horti.* **138**: 24-35.
- Görg A., Obermaier C., Boguth G., Harder A., Scheibe B., Wildgruber R., Weiss W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**: 1037-1053.
- Gross S.M., Martin J.A., Simpson J., Abraham-Juarez M.J., Wang Z., Visel A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics* **14**: 563.
- Groszmann M., Greaves I.K., Fujimoto R., Peacock W.J., Dennis E.S. (2013). The role of epigenetics in hybrid vigour. *Trends Genet.* **29**: 684-690.
- Groszmann M., Greaves I.K., Albert N., Fujimoto R., Helliwell C.A., Dennis E.S., Peacock W.J. (2011). Epigenetics in plants – vernalisation and hybrid vigour. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* **1809**: 427-437.
- Gu J., Yin X., Stomph T.J., Wang H., Struik P.C. (2012). Physiological basis of genetic variation in leaf photosynthesis among rice (*Oryza sativa* L.) introgression lines under drought and well-watered conditions. *J. Exp. Bot.* **63**: 5137-5153.
- Guendouz A., Guessoum S., Maamri K., Benidir M., Hafsi M. (2013). Flag leaf reflectance efficiency as indicator for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) under semi arid conditions. *Int. J. Agron. Plant Product.* **4**: 1204-1215.
- Guha A., Sengupta D., Reddy A.R. (2013). Polyphasic chlorophyll a fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **119**: 71-83.
- Guo P., Baum M., Varshney R.K., Graner A., Grando S., Ceccarelli S. (2008). QTLs for chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters in barley under post-flowering drought. *Euphytica* **163**: 203-214.
- Guo Z., Ou W., Lu S., Zhong Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiol. Biochem.* **44**: 828-836.
- Guóth A., Tari I., Gallé Á., Csiszár J., Pécsváradi A., Cseuz L., Erdei L. (2009). Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: Changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels, and grain yield. *J. Plant Growth Regul.* **28**: 167-176.
- Hajheidari M., Abdollahian-Noghabi M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S.Y., Ober E.S., Salekdeh G.H. (2005). Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics* **5**: 950-960.
- Hajheidari M., Eivazi A., Buchanan B.B., Wong J.H., Majidi I., Salekdeh G.H. (2007). Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *J. Proteome Res.* **6**: 1451-1460.
- Hakeem K.R., Chandna R., Ahmad P., Iqbal M., Ozturk M. (2012). Relevance of proteomic investigations in plant abiotic stress physiology. *OMICS J. Integr. Biol.* **16**: 621-635.
- Haldrup A., Naver H., Scheller H.V. (1999). The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic *Arabidopsis* plants lacking the PSI-N subunit of photosystem. *Plant J.* **17**: 689-698.
- Hall, D.O. (1972). Nomenclature for isolated chloroplasts. *Nature New Biol.* **235**: 125-126.
- Han X., Aslanian A., Yates J.R. (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12**: 483-490.
- Hanke G., Mulo P. (2013). Plant type ferredoxins and ferredoxin-dependent metabolism. *Plant Cell Environ.* **36**: 1071-1084.
- Harbinson J., Prinzenberg A.E., Kruijer W., Aarts M.G.M. (2012). High throughput screening with chlorophyll fluorescence imaging and its use in crop improvement. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**: 221-226.
- Hashiguchi A., Ashan N., Komatsu S. (2007). Proteomics application of crops in the context of climatic changes. *Food Res. Int.* **43**: 1803-1813.
- Hatfield J.L., Quisenberry J.E., Dilbeck R.E. (1987). Use of canopy temperatures to identify water conservation in cotton germplasm. *Crop Sci.* **27**: 269-273.
- He C., Zhang J., Duan A., Zheng S., Sun H., Fu L. (2008). Proteins responding to drought and high-temperature stress in *Populus × euramericana* cv. '74/76'. *Trees* **22**: 803-813.
- He G., He H., Deng X.W. (2013). Epigenetic variations in plant hybrids and their potential roles in heterosis. *J. Genet. Genomics* **40**: 205-210.
- Herrera J.M., Verhulst N., Govaerts B. (2012). Strategies to identify genetic diversity in root traits. In: Reynolds M.P., Pask J.D., Mullan D.M. (eds): Physiological Breeding I: Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation. CIMMYT, Mexico, pp. 97-108.
- Ho C.L., Noji M., Saito M., Yamazaki M., Saito K. (1998). Molecular characterization of plastidic phosphoserine aminotransferase in serine biosynthesis from *Arabidopsis*. *Plant J.* **16**: 443-452.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 431-438.
- Holá D. (1999). The content of light-harvesting complexes in different maize (*Zea mays* L.) genotypes. *Photosynthetica* **37**: 489-492.
- Holá D., Kočová M., Körnerová M., Sofrová D., Sopko B. (1999). Genetically based differences in photochemical activities of isolated maize (*Zea mays* L.) mesophyll chloroplasts. *Photosynthetica* **36**: 187-197.

- Holá D., Kočová M., Rothová O., Wilhelmová N., Benešová M. (2007). Recovery of maize (*Zea mays* L.) inbreds and hybrids from chilling stress of various duration: Photosynthesis and antioxidant enzymes. *J. Plant Physiol.* **164**: 868-877.
- Holá D., Langrová K., Kočová M., Rothová O. (2003). Photosynthetic parameters of maize (*Zea mays* L.) inbred lines and their F1 hybrids: their different response to, and recovery from rapid or gradual onset of low-temperature stress. *Photosynthetica* **41**: 429-442.
- Holzwarth A.R., Lenk D., Jahns P. (2013). On the analysis of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching curves: I. Theoretical considerations. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1827**: 786-792.
- Hossain Z., Nouri M.Z., Komatsu S. (2012). Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. *J. Proteomics Res.* **11**: 37-48.
- Hu H., Xiong L. (2014). Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**: 3.1-3.27.
- Hu L., Wang Z., Du H., Huang B. (2010a). Differential accumulation of dehydrins in response to water stress for hybrid and common bermudagrass genotypes differing in drought tolerance. *J. Plant Physiol.* **167**: 103-109.
- Hu X., Li Y., Li C., Yang H., Wang W., Lu M. (2010b). Characterization of small heat shock proteins associated with maize tolerance to combined drought and heat stress. *J. Plant Growth Regul.* **29**: 455-464.
- Hu X., Lu M., Li C., Liu T., Wang W., Wu J., Tai F., Li X., Zhang J. (2011). Differential expression of proteins in maize roots in response to abscisic acid and drought. *Acta Physiol. Plant.* **33**: 2437-2446.
- Hu X., Wu X., Li C., Lu M., Liu T., Wang Y., Wang W. (2012). Abscisic acid refines the synthesis of chloroplast proteins in maize (*Zea mays*) in response to drought and light. *PLoS ONE* **7**: e49500.
- Huerta-Ocampo J.A., Briones-Cerecero E.P., Mendoza-Hernández G., de Leon-Rodríguez A., Barba de la Rosa A.P. (2009). Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *Int. J. Plant Sci.* **170**: 990-998.
- Hura T., Hura K., Grzesiak S. (2008). Contents of total phenolics and ferulic acid, and PAL activity during water potential changes in leaves of maize single-cross hybrids of different drought tolerance. *J. Agron. Crop Sci.* **194**: 104-112.
- Huseynova I.M. (2012). Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1817**: 1516-1523.
- Hussain S.S., Iqbal M.T., Arif M.A., Amjad M. (2011). Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. *Biol. Plant.* **55**: 401-413.
- Chaudhuri U.N., Deaton M.L., Kanemasu E.T., Wall G.W., Marcarian V., Dobrenz A.K. (1986). A procedure to select drought-tolerant sorghum and millet genotypes using canopy temperature and vapor pressure deficit. *Agron. J.* **70**: 490-494.
- Chaudhuri U.N., Kanemasu E.T. (1982). Effect of water gradient on sorghum growth, water relations and yield. *Can. J. Plant Sci.* **62**: 599-607.
- Cha-um S., Wangmoon S., Mongkolsiriwatana C., Ashraf M., Kirdmanee C. (2012). Evaluating sugarcane (*Saccharum* sp.) cultivars for water deficit tolerance using some key physiological markers. *Plant Biotechnol.* **29**: 431-439.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* **103**: 551-560.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. (2003). Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Funct. Plant Biol.* **30**: 239-264.
- Chaves M.M., Oliveira M.M. (2004). Mechanisms underlying plant resistance to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *J. Exp. Bot.* **55**: 2365-2384.
- Chaves M.M., Pereira J.S., Maroco J., Rodrigues M.L., Ricardo C.P.P., Osório M.L., Carvalho I., Faria T., Pinheiro C. (2002). How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* **89**: 907-916.
- Chen X., Mon D., Xasir T.A., Hu Y.G. (2012). Evaluation of 14 morphological, yield-related and physiological traits as indicators of drought tolerance in Chinese winter bread wheat revealed by analysis of the membership function value of drought tolerance (MFVD). *Field Crop. Res.* **137**: 195-201.
- Chen Z. J. (2013). Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis. *Nature Rev. Genet.* **14**: 471-482.
- Chen Z., Wu F., Wang X., Zhang G. (2005). Heterosis in CMS hybrids of cotton for photosynthetic and chlorophyll fluorescence parameters. *Euphytica* **144**: 353-361.
- Chohan M.S.M., Saleem M., Ahsan M., Asghar M. (2012). Genetic analysis of water stress tolerance and various morpho-physiological traits in *Zea mays* L. using graphical approach. *Pak. J. Nutri.* **11**: 489-500.
- Christensen C.A., Feldmann K.A. (2007). Biotechnology approaches to engineering drought tolerant crops. In: Jenks M.A., Hasegawa P.M., Jain, S.M. (eds.): *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 333-357.
- Chugh V., Kaur N., Gupta A.K. (2011). Evaluation of oxidative stress tolerance in maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to drought. *Ind. J. Biochem. Biophys.* **48**: 47-53.
- Chutipajit S., Cha-um S., Sompornpailin K. (2012). An evaluation of water deficit tolerance screening in pigmented indica rice genotypes. *Pak. J. Bot.* **44**: 65-72.
- Ifuku K., Ishihara S., Sato F. (2010). Molecular functions of oxygen-evolving complex family proteins in photosynthetic electron flow. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 723-734.
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* **27**: 325-333.
- Jabeen F., Shahbaz M., Ashraf M. (2008). Discriminating some prospective cultivars of maize (*Zea mays* L.) for drought tolerance using gas exchange characteristics and proline contents as physiological markers. *Pak. J. Bot.* **40**: 2329-2343.
- Jagtap V., Bhargava S. (1995). Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. exposed to high light, low water and high temperature stress. *J. Plant Physiol.* **145**: 195-197.
- Jaleel C.A., Manivannan P., Wahid A., Farooq M., Al-Juburi H.J., Somasundaram R., Panneerselvam R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agr. Biol.* **11**: 100-105.

- Jamaux I., Steinmetz A., Belhassen E. (1997). Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. *New Phytol.* **137**: 117-127.
- Jangpromma N., Kitthaisong S., Lomthaisong K., Daduang S., Jaisil P., Thammasirirak S. (2010). A proteomics analysis of drought-stress responsive proteins as a biomarker for drought-tolerant sugarcane cultivars. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **6**: 89-102.
- Jensen P.E., Gilpin M., Knoetzel J., Scheller H.V. (2000). The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *J. Biol. Chem.* **275**: 24701-24708.
- Ji K., Wang Y., Sun W., Lou Q., Mei H., Shen S., Chen H. (2012). Drought-responsive mechanisms in rice genotypes with contrasting drought tolerance during reproductive stage. *J. Plant Physiol.* **169**: 336-344.
- Jiang S.S., Liang X.N., Li X., Wang S.L., Lu D.W., Ma C.Y., Li X.H., Ma W.J., Yan Y.M. (2012). Wheat drought-responsive grain proteome analysis by linear and nonlinear 2-DE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 16065-16083.
- Jones H.G., Serraj R., Loveys B.R., Xiong L., Wheaton A., Price A.H. (2009). Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct. Plant Biol.* **36**: 978-989.
- Jongrunklang N., Toomsan B., Vorasoot N., Jogloy S., Kesmala T., Patanothai A. (2008). Identification of peanut genotypes with high water use efficiency under drought stress conditions from peanut germplasm of diverse origins. *Asian J. Plant Sci.* **7**: 628-638.
- Kadioglu A., Terzi R., Saruhan N., Saglam A. (2012). Current advances in the investigation of leaf rolling caused by biotic and abiotic stress factors. *Plant Sci.* **182**: 42-48.
- Kamoshita A., Babu R.C., Boopathi N.M., Fukai S. (2008). Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. *Field Crop. Res.* **109**: 1-23.
- Kang G., Li G., Xu W., Peng X., Han Q., Zhu Y., Guo T. (2012). Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. *J. Proteome Res.* **11**: 6066-6079.
- Karimizadeh R., Mohammadi M., Ghaffaripour S., Karimpour F., Shefazadeh M.K. (2011). Evaluation of physiological screening techniques for drought-resistant breeding of durum wheat genotypes in Iran. *Afr. J. Biotechnol.* **10**: 12107-12117.
- Kashiwagi J., Upadhyaya H.D., Krishnamurthy L. (2010). Significance and genetic diversity of SPAD chlorophyll meter reading (SCMR) in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm in the semi-arid environments. *J. Food Legumes* **23**: 99-105.
- Kausar R., Arshad M., Shahzad A., Komatsu S. (2012). Proteomics analysis of sensitive and tolerant barley genotypes under drought stress. *Amino Acids* **44**: 345-359.
- Ke Y., Han G., He H., Li J. (2009). Differential regulation of proteins and phosphoproteins in rice under drought stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**: 133-138.
- Keck R.W., Boyer J.S. (1974). Chloroplast response to low leaf water potentials. III. Differing inhibition of electron transport and photophosphorylation. *Plant Physiol.* **53**: 474-479.
- Keenan T., Sabate S., Gracia C. (2010). Soil water stress and coupled photosynthesis-conductance models: Bridging the gap between conflicting reports on the relative roles of stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis. *Agric. For. Meteorol.* **150**: 443-453.
- Khalili M., Aboughadareh A.P., Naghavi M.R. (2013). Screening of drought tolerant cultivars in barley using morpho-physiological traits and Integrated Selection Index under water deficit stress condition. *Adv. Crop Sci.* **3**: 462-471.
- Khamssi N.N., Najaphy A. (2012). Comparison of photosynthetic components of wheat genotypes under rain-fed and irrigated conditions. *Photochem. Photobiol.* **88**: 76-80.
- Khan H.R., Link W., Hocking T.J., Stoddard F.L. (2007). Evaluation of physiological traits for improving drought tolerance in faba bean (*Vicia faba* L.). *Plant Soil* **292**: 205-217.
- Khanna-Chopra R., Selote D.S. (2007). Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environ. Exp. Bot.* **60**: 276-283.
- Kholová J. (2006). Vliv hypoxických a posthypoxických podmínek na fyziologické a morfologické charakteristiky kukuřice a genetické efekty uplatňující se v jejich dědičnosti. *Diplomová práce*, Přírodovědecká fakulta UK v Praze.
- Khraiwesh B., Zhu J.K., Zhu J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* **1819**: 137-148.
- Kido E.A., Neto J.R.C.F., Silva R.L.D., Pandolfi V., Guimarães A.C.R., Veiga D.T., Chabregas S.M., Crovella S., Benko-Iseppon A.M. (2012). New insights in the sugarcane transcriptome responding to drought stress as revealed by supersage. *Sci. World J.* **2012**: 821062.
- Kim J.M., To T.K., Ishida J., Morosawa T., Kawashima M., Matsui A., Toyoda T., Kimura H., Shinozaki K., Seki M. (2008). Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1580-1588.
- Kinnersley A.M., Turano F.J. (2000). Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit. Rev. Plant Sci.* **19**: 479-509.
- Kočová M., Holá D., Rothová O., Kvasnica M., Kohout L. (2010). The effects of brassinosteroids on photosynthetic parameters in leaves of two field-grown maize inbred lines and their F₁ hybrid. *Biol. Plant.* **54**: 785-788.
- Kočová M., Holá D., Wilhelmová N., Rothová O. (2009). The influence of low-temperature on the photochemical activity of chloroplasts and activity of antioxidant enzymes in maize leaves. *Biol. Plant.* **53**: 475-483.
- Kohli A., Sreenivasulu N., Lakshmanan P., Kumar P.P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Rep.* **32**: 945-957.
- Kolarovič L., Valentovič P., Luxová M., Gašpariková O. (2009). Changes in antioxidants and cell damage in heterotrophic maize seedlings differing in drought sensitivity after exposure to short-term osmotic stress. *Plant Growth Regul.* **59**: 21-26.
- Komatsu S., Hossain Z. (2013). Organ specific proteome analysis for identification of abiotic stress response mechanism in crop. *Front. Plant Sci.* **4**: 71.

- Körnerová M., Holá D. (1999). The effect of low growth temperature on Hill reaction and photosystem I activities and pigment contents in maize inbred lines and their F1 hybrids. *Photosynthetica* **37**: 477-488.
- Kościelniak J., Filek W., Biesaga-Kościelniak J. (2006). The effect of drought stress on chlorophyll fluorescence in *Lolium-Festuca* hybrids. *Acta Physiol. Plant.* **28**: 149-158.
- Kosmala A., Perlikowski D., Pawłowicz I., Rapacz M. (2012). Changes in the chloroplast proteome following water deficit and subsequent watering in a high- and a low-drought-tolerant genotype of *Festuca arundinacea*. *J. Exp. Bot.* **63**: 6161-6172.
- Kosová K., Prášil I.T., Vítámvás P. (2010). The role of dehydrins in plant stress response. In: Pessarakli M. (ed.): Handbook of Plant and Crop Stress (3rd ed.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 239-285.
- Kosová K., Vítámvás P., Prášil I.T., Renaut J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress – contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *J. Proteomics* **74**: 1301-1322.
- Kottapalli K.R., Rakwal R., Shibato J., Burow G., Tissue D., Burke J., Puppala N., Burow M., Payton P. (2009). Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant Cell Environ.* **32**: 380-407.
- Krebs D., Synková H., Avratovščuková N., Kočová M., Šesták Z. (1996). Chlorophyll fluorescence measurements for genetic analysis of maize cultivars. *Photosynthetica* **32**: 595-608.
- Krech K., Ruf S., Masduki F.F., Thiele W., Bednarczyk D., Albus C.A., Tiller N., Hasse C., Schöttler M.A., Bock T. (2012). The plastid genome-encoded Ycf4 protein functions as a nonessential assembly factor for Photosystem I in higher plants. *Plant Physiol.* **159**: 579-591.
- Kulcheski F.R., de Oliveira L.F.V., Molina L.G., Almerão M.P., Rodrigues F.A., Marcolino J., Barbosa J.F., Stolf-Moreira R., Nepomuceno A.L., Marcelino-Guimarães F.C., Abdelnoor R.V., Nascimento L.C., Carazzolle M.F., Pereira G.A.G., Margis R. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stressess. *BMC Genomics* **12**: 307.
- Kulwal P.L., Thudi M. Varshney R.K. (2011). Genomic interventions in crop breeding for sustainable agriculture. In: Meyers R.A. (ed.): Encyclopedia of Sustainable Science and Technology. Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, doi:10.1007/978-1-4419-0851-3.
- Kumar A., Singh D.P. (1998). Use of physiological indices as a screening technique for drought tolerance in oilseed *Brassica* species. *Ann. Bot.* **81**: 413-420.
- Kumar J., Abbo S. (2001). Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments. *Adv. Agron.* **72**: 107-138.
- Kutík J., Holá D., Kočová M., Rothová O., Haisel D., Wilhelmová N., Tichá I. (2004). Ultrastructure and dimensions of chloroplasts in leaves of three maize (*Zea mays* L.) inbred lines and their F₁ hybrids grown under moderate chilling stress. *Photosynthetica* **44**: 447-455.
- Langridge P., Paltridge N., Fincher G. (2006). Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Brief. Funct. Genomics Proteomics* **4**: 343-354.
- Lascano H.R., Antonicegli G.E., Luna C.M., Melchiorre M.N., Gómez L.D., Racca R.W., Trippi V.S., Casano L.M. (2001). Antioxidant system response of different wheat cultivars under drought: field and *in vitro* studies. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 1095-1102.
- Lata C., Jha S., Dixit V., Sreenivasulu N., Prasad M. (2011). Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars [*Setaria italica* (L.)]. *Protoplasma* **248**: 817-828.
- Lawlor D.W. (2002). Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomata vs. metabolism and the role of ATP. *Ann. Bot.* **89**: 871-885.
- Lawlor D.W., Cornic G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ.* **25**: 275-294.
- Lawlor D.W., Tezara W. (2009). Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Ann. Bot.* **103**: 561-579.
- Lazár D. (2013). Simulations show that a small part of variable chlorophyll *a* fluorescence originates in photosystem I and contributes to overall fluorescence rise. *J. Theor. Biol.* **335**: 249-264.
- Leidi E.O., López M., Gorham J., Gutiérrez J.C. (1999). Variation in carbon isotope discrimination and other traits related to drought tolerance in upland cotton cultivars under dryland conditions. *Field Crop. Res.* **61**: 109-123.
- Lenka S.K., Katiyar A., Chinnusamy V., Bansal K.C. (2010). Comparative analysis of drought-responsive transcriptome in *Indica* rice genotypes with contrasting drought tolerance. *Plant Biotechnol. J.* **9**: 315-327.
- Li X., Ding Z., Li L., Wang M., Zhao M. (2007). Heterosis of maize photosynthetic performance. *Front. Agric. China* **1**: 411-417.
- Li Y.C., Meng F.R., Zhang C.Y., Zhang N., Sun M.S., Ren J.P., Niu H.B., Wang X., Yin J. (2012). Comparative analysis of water stress-responsive transcriptomes in drought-susceptible and -tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Biol.* **55**: 349-360.
- Lichtenthaler H.K., Buschmann C., Knapp M. (2005). How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R_{FD} of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* **43**: 379-393.
- Lin C.S., Binns M.R., Lefkovitch L.P. (1986). Stability analysis: where do we stand? *Crop Sci.* **26**: 894-900.
- Linke R., Richter K., Haumann J., Schneider W., Waihs P. (2008). Occurrence of repeated drought events: can repetitive stress situations and recovery from drought be traced with leaf reflectance? *Period. Biol.* **110**: 219-229.
- Lisson S.N., Inman-Bamber N.G., Robertson M.J., Keating B.A. (2005). The historical and future contribution of crop physiology and modelling research to sugarcane production systems. *Field Crop. Res.* **92**: 321-335.
- Liu J.X., Bennett J. (2011). Reversible and irreversible drought-induced changes in the anther proteome of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes IR64 and Moroberekan. *Mol. Plant.* **4**: 59-69.
- Liu T., Zhang L., Yuan Z., Hu X., Lu M., Wang W., Wang Y. (2013). Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. *Acta Physiol. Plant.* **35**: 501-513.

- Loggini B., Scartazza A., Brugnoli E., Navari-Izzo F. (1999). Antioxidative defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol.* **119**: 1091-1099.
- Long S.P., Bernacchi C.J. (2003). Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J. Exp. Bot.* **54**: 2393-2401.
- Long S.P., Farage P.G., Garcia R.L. (1996). Measurement of leaf and canopy photosynthetic CO₂ exchange in the field. *J. Exp. Bot.* **47**: 1629-1642.
- Longenberger P.S., Smith C.W., Duke S.E., McMichael B.L. (2009). Evaluation of chlorophyll fluorescence as a tool for the identification of drought tolerance in upland cotton. *Euphytica* **166**: 25-33.
- Lopes M., Nogués S., Molero G. (2012). Gas exchange and chlorophyll fluorescence – principles and applications. In: Reynolds M.P., Pask J.D., Mullan D.M. (eds): *Physiological Breeding I: Interdisciplinary Approaches to Improve Crop Adaptation*. CIMMYT, Mexico, pp. 81-96.
- Lopes M.S., Araus J.L., van Heerden P.D.R., Foyer C.H. (2011). Enhancing drought tolerance in C₄ crops. *J. Exp. Bot.* **62**: 3135-3153.
- López-Calcano P.E., Howard T.P., Raines C.A. (2014). The CP12 protein family: a thioredoxin-mediated metabolic switch? *Front. Plant Sci.* **5**: 9.
- Lu Y., Hao Z., Xie C., Crossa J., Araus J.L., Gao S., Vivek B.S., Magorokosho C., Mugo S., Makumbi D., Taba S., Pan G., Li X., Rong T., Zhang S., Xu Y. (2011). Large-scale screening for maize drought resistance using multiple selection criteria evaluated under water-stressed and well-watered environments. *Field Crop. Res.* **124**: 37-45.
- Ludlow M.M., Muchow R. C. (1990). A critical evaluation of trait for improving crop yields in water-limited environments. *Adv. Agron.* **42**: 107-153.
- Lushy A., Verchovsky L., Nechushtai R. (2002). The stable assembly of newly synthesized Psae into the photosystem I complex occurring via the exchange mechanism is facilitated by electrostatic interactions. *Biochemistry* **41**: 11192-11199.
- Macar T.K., Ekmekçi Y. (2009). Alterations in photochemical and physiological activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under drought stress. *J. Agron. Crop Sci.* **195**: 335-346.
- Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J., Bressan R.A. (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *Plant J.* **31**: 699-712.
- Maksup S., Roytrakul S., Subaibulwatana K. (2012). Physiological and comparative proteomic analyses of Thai jasmine rice and two check cultivars in response to drought stress. *J. Plant Interact.* **9**: 43-55.
- Malan C., Greyling M.M., Gressel J. (1990). Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Sci.* **69**: 157-166.
- Martin W., Scheibe R., Schnarrenberger C. (2000). The Calvin cycle and its regulation. In: Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. (eds.): *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (Advances in Photosynthesis, Vol. 9). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 9-51.
- Martinez-Ballesta M.C., Carvajal M. (2014). New challenges in plant aquaporin biotechnology. *Plant Sci.* **217-218**: 71-77.
- McCarty R.E., Evron Y., Johnson E.A. (2000). The chloroplast ATP synthase: a rotary enzyme? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 83-109.
- Medrano H., Escalona J.M., Bota J., Gulías J., Flexas J. (2002). Regulation of photosynthesis of C₃ plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Ann. Bot.* **89**: 895-2002.
- Mehta H., Sarkar K.R., Sharma S.K. (1992). Genetic analysis of photosynthesis and productivity in corn. *Theor. Appl. Genet.* **84**: 242-255.
- Méchin V., Balliau T., Château-Joubert S., Davanture M., Langella O., Négroni L., Prioul J.L., Thévenot C., Zivy M., Damerval C. (2004). A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry* **65**: 1609-1618.
- Merewitz E.B., Gianfagna T., Huang B. (2011). Protein accumulation in leaves and roots associated with improved drought tolerance in creeping bentgrass expressing an *ipt* gene for cytokinin synthesis. *J. Exp. Bot.* **62**: 5311-5333.
- Minkov I.N., Jahoubjan G.T., Denov I.D., Toneva A.T. (1999). Photooxidative stress in higher plants. In: Pessarakli M., (ed.): *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 499-525.
- Mir R.R., Zaman-Allah M., Sreenivasulu N., Trethowan R., Varshney R.K. (2012). Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. *Theor. Appl. Genet.* **125**: 625-645.
- Mirzaei M., Pascovici D., Atwell B.J., Haynes P.A. (2012a). Differential regulation of aquaporins, small GTPases and V-ATPases proteins in rice leaves subjected to drought stress and recovery. *Proteomics* **12**: 864-677.
- Mirzaei M., Soltani N., Sarhadi E., Pascovici D., Keighley T., Salekdeh G.H., Haynes P.A., Atwell B.J. (2012b). Shotgun proteomics analysis of long-distance drought signaling in rice roots. *J. Proteome Res.* **11**: 348-358.
- Mishra A.K., Singh V.P. (2010). A review of drought concepts. *J. Hydrol.* **391**: 202-216.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405-410.
- Mittler R., Blumwald E. (2010). Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 443-462.
- Mohammadi P.P., Moieni A., Hiraga S., Komatsu S. (2012a). Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *J. Proteomics* **75**: 1906-1923.
- Mohammadi P.P., Moieni A., Komatsu S. (2012b). Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. *Amino Acids* **43**: 2137-2152.
- Mohammadkhani N., Heidari R. (2008). Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. *Turk. J. Biol.* **32**: 23-30.
- Mohayjeji M., Capriotti A.L., Cavaliere C., Piovesana S., Samperi R., Stampachiacchiere S., Toorchi M., Lagana A. (2014). Heterosis profile of sunflower leaves: a label free proteomics approach. *J. Proteomics* **99**: 101-110.
- Mojayad F., Planchon C. (1994). Stomatal and photosynthetic adjustment to water deficit as the expression of heterosis in sunflower. *Crop Sci.* **34**: 103-107.
- Molinari H.B.C., Marur C.J., Daros E., de Campos, M.K.F., de Carvalho, J.F.R.P., Filho J.C.B., Pereira L.F.P., Vieira L.G.E. (2007). Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. *Physiol. Plant.* **130**: 218-229.

- Monneveux P., Jing R., Misra S.C. (2012). Phenotyping for drought adaptation in wheat using physiological traits. *Front. Physiol.* **3**: 429.
- Monneveux P., Ramírez D.A., Pino M.T. (2013). Drought tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.). Can we learn from drought tolerance research in cereals? *Plant Sci.* **205-206**: 76-86.
- Montes J.M., Melchinger A.E., Reif J.C. (2007). Novel throughput phenotyping platforms in plant genetic studies. *Trends Plant Sci.* **12**: 433-436.
- Moore A.L., Siedow J.N. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1059**: 121-140.
- Moreno J.I., Martín R., Castresana C. (2005). *Arabidopsis* SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J.* **41**: 451-463.
- Morison J.I.L., Baker N.R., Mullineaux P.M., Davies W.J. (2008). Improving water use in crop production. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**: 639-658.
- Moumeni A., Satoh K., Kondoh H., Asano T., Hosaka A., Venuprasad R., Serraj J., Kumar A., Leung H., Kikuchi S. (2011). Comparative analysis of root transcriptome profiles of two pairs of drought-tolerant and susceptible rice near-isogenic lines under different drought stress. *BMC Plant Biol.* **11**: 174.
- Moussa H.R., Abdel-Aziz S.M. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Aust. J. Crop Sci.* **1**: 31-36.
- Munné-Bosch S. (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol.* **162**: 743-748.
- Munné-Bosch S., Alegre L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **21**: 31-57.
- Munns R., James R.A., Sirault X.R.R., Furbank R.T., Jones H.G. (2010). New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *J. Exp. Bot.* **61**: 3499-3507.
- Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. (2007). Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1767**: 414-421.
- Murchie E.H., Lawson T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* **64**: 3983-3988.
- Mutava R.N., Prasad P.V.V., Tuinstra M.R., Kofoid K.D., Yu J. (2011). Characterization of sorghum genotypes for traits related to drought tolerance. *Field Crop. Res.* **123**: 10-18.
- Muthurajan M., Shobbar Z.S., Jagadish S.V.K., Bruskewich R., Ismail A., Leung H., Bennett J. (2010). Physiological and proteomic responses of rice peduncles to drought stress. *Mol. Biotechnol.* **48**: 173-182.
- Mutisya J., Siteney J.K., Gichuki S.T. (2010). Phenotypic and physiological aspects related to drought tolerance in sorghum. *Afr. Crop Sci. J.* **18**: 175-182.
- Narita Y., Taguchi H., Nakamura T., Ueda A., Shi W., Takabe T. (2004). Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Sci.* **167**: 1009-1016.
- Naylor R.L., Falcon W.P., Goodman R.M., Jahn M.M., Sengooba T., Tefera H., Nelson R.J. (2004). Biotechnology in the developing world: a case for increased investments in orphan crops. *Food Policy* **29**: 15-44.
- Neilson J.A.D., Durnford D.G. (2010). Structural and functional diversification of the light-harvesting complexes in photosynthetic eukaryotes. *Photosynth. Res.* **106**: 57-71.
- Ngugi K., Collins J.O., Muchira S. (2013). Combining, earliness, short anthesis to silking interval and yield based selection indices under intermittent water stress to select for drought tolerant maize. *Aust. J. Crop Sci.* **7**: 2014-2020.
- Noctor G., Foyer C.H. (1998). Ascorbate and glutathione. Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249-279.
- Norouzi M., Toorchi M., Hosseini Salekdeh G., Mohammadi S.A., Neyshabouri M.R., Aharizad S. (2008). Effect of water deficit on growth, grain yield and osmotic adjustment in rapeseed. *J. Food Agric. Environ.* **6**: 312-318.
- O'Neill P.M., Shanahan J.F., Schepers J.S. (2006). Use of chlorophyll fluorescence assessments to differentiate corn hybrid response to variable water conditions. *Crop Sci.* **46**: 681-687.
- Oeljeklaus S., Meyer H.E., Warscheid B. (2009). Advancements in plant proteomics using quantitative mass spectrometry. *J. Proteomics* **72**: 545-554.
- Oelke E.A., Andrew R.H. (1966). Chlorophyll relationships for certain sweet corn genotypes in different environments. *Crop Sci.* **6**: 113-116.
- Olivares-Villegas J.J., Reynolds M.P., McDonald G.K. (2007). Drought-adaptive attributes in the Seri/Babax hexaploid wheat population. *Funct. Plant Biol.* **34**: 189-203.
- Oliver M.J., Jain R., Balbuena T.S., Agrawal G., Gasulla F., Thelen J.J. (2011). Proteome analysis of leaves of the desiccation-tolerant grass, *Sporobolus stapfianus*, in response to dehydration, *Phytochemistry* **72**: 1273-1284.
- Oukarroum A., El Madidi S., Schansker G., Strasser R.J. (2007). Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environ. Exp. Bot.* **60**: 438-446.
- Oxborough K. (2004). Imaging of chlorophyll *a* fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *J. Exp. Bot.* **55**: 1195-1205.
- Pagliano C., Saracco G., Barber J. (2013). Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II. *Photosynth. Res.* **116**: 167-188.
- Painawadee M., Jogloy S., Kesmala T., Akkasaeng C., Patanothai A. (2009). Identification of traits related to drought resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Asian J. Plant Sci.* **8**: 120-128.
- Paknejad F., Nasri M., Moghadam H.R.T., Zahedi H., Alahmadi M.J. (2007). Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. *J. Biol. Sci.* **7**: 841-847.
- Pandey A., Chakraborty S., Datta A., Chakraborty N. (2008). Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol. Cell Proteomics* **7**: 88-107.
- Parida A.K., Dagaonkar V.S., Phalak M.S., Umalkar G.V., Aurangabadkar L.P. (2007). Alterations in photosynthetic pigments, protein and osmotic components in cotton genotypes subjected to short-term drought stress followed by recovery. *Plant Biotechnol. Rep.* **1**: 37-48.
- Parry M.A.J., Andralojc P.J., Khan S., Lea P.J., Keys A.J. (2002). Rubisco activity: effects of drought stress. *Ann. Bot.* **89**: 833-839.

- Parry M.A.J., Flexas J., Medrano H. (2005). Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. *Ann. Appl. Biol.* **147**: 211-226.
- Passioura J.B. (1977). Grain yield, harvest index, and water use of wheat. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* **43**: 117-120.
- Pekic S., Quarrie S.A. (1987). Abscissic acid accumulation in lines of maize differing in drought resistance: a comparison of intact and detached leaves. *J. Plant Physiol.* **127**: 203-217.
- Peng Z., Wang M., Li F., Lv H., Li C., Xia G. (2009). A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Mol. Cell Proteomics* **8**: 2676-2686.
- Peñuelas J., Filella L., Biel C., Serrano L., Savé R. (1993). The reflectance at the 950–970 nm region as an indicator of plant water status. *Int. J. Remote Sens.* **14**: 1887-1905.
- Peñuelas J., Gamon J.A., Fredeen A.L., Merino J., Field C.B. (1994). Reflectance indices associated with physiological changes in nitrogen- and water-limited sunflower leaves. *Remote Sens. Environ.* **48**: 135-146.
- Pereira L.S., Oweis T., Zain A. (2002). Irrigation management under water scarcity. *Agric. Water Manag.* **57**: 175-206.
- Peters H.I., Chang Y.W.E., Traugh J.A. (1995). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) by protein kinase C stimulates GDP/GTP-exchange activity. *Eur. J. Biochem.* **234**: 550-556.
- Petersen J., Rogowska-Wrzęsinska A., Jensen O.N. (2013). Functional proteomics of barley and barley chloroplasts – strategies, methods and perspectives. *Front. Plant Sci.* **4**: Article 52.
- Pfündel E.E., Klughammer C., Meister A., Cerovic Z.G. (2013). Deriving fluorometer-specific values of relative PSI fluorescence intensity from quenching of F_0 fluorescence in leaves of *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays*. *Photosynth. Res.* **114**: 189-206.
- Pinheiro C., Chaves M.M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *J. Exp. Bot.* **62**: 869-882.
- Pinheiro C., Kehr J., Ricardo C.P. (2005). Effect of water stress on lupin stem protein analysed by two-dimensional gel electrophoresis. *Planta* **221**: 716-728.
- Pons T.L., Flexas J., von Caemmerer S., Evans J.R., Genty B., Ribas-Carbo M., Brugnoli E. (2009). Estimating mesophyll conductance to CO₂: methodology, potential errors, and recommendations. *J. Exp. Bot.* **60**: 2217-2234.
- Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **975**: 384-394.
- Pospíšil P. (2011). Enzymatic function of cytochrome *b₅₅₉* in photosystem II. *J. Photochem. Photobiol. B.* **104**: 341-347.
- Pospíšilová J., Šantrůček J. (1994). Stomatal patchiness. *Biol. Plant.* **36**: 481-510.
- Pourtaghi A., Darvish F., Habibi D., Nourmohammadi G., Daneshian J. (2011). Effect of irrigation water deficit on antioxidant activity and yield of some sunflower hybrids. *Aust. J. Crop Sci.* **5**: 197-204.
- Procházková D., Sairam R.K., Lekshmy S., Wilhelmová N. (2013). Differential response of a maize hybrid and its parental lines to salinity stress. *Czech J. Plant Genet. Breed.* **49**: 9-15.
- Quan L.J., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y. (2008). Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network. *J. Integr. Plant Biol.* **50**: 2-18.
- Quan R., Shang M., Zhang H., Zhao Y., Zhang J. (2004). Engineering of enhanced glycine betaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnol. J.* **2**: 477-486.
- Qureshi M. I., Qadir S., Zolla L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *J. Plant Physiol.* **164**: 1239-1260.
- Rahbarian R., Khavari-Nejad R., Ganjeali A., Bagheri A., Najafi F. (2011). Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Acta Biol. Cracov. Bot.* **53**: 47-56.
- Ramanjulu S., Bartels D. (2002). Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* **25**: 141-151.
- Rashid A., Stark J.C., Tanveer A., Mustafa T. (1999). Use of canopy temperature measurements as a screening tool for drought tolerance in spring wheat. *J. Agron. Crop Sci.* **182**: 231-237.
- Rasmussen S., Barah P., Suarez-Rodriguez M.C., Bressendorff S., Friis P., Costantino P., Bones A.M., Nielsen H.B., Mundy J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **161**: 1783-1794.
- Ravanel S., Block M.A., Rippert P., Jabrin S., Curien G., Rébeillé F., Douce R. (2004). Methionine metabolism in plants: chloroplasts are autonomous for *de novo* methionine synthesis and can import S-adenosylmethionine from the cytosol. *J. Biol. Chem.* **279**: 22548-22557.
- Ravanel S., Gakière B., Job D., Douce R. (1998). The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 7805-7812.
- Reddy A.R., Chaitanya K.V., Vivekanandan M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* **161**: 1189-1202.
- Remmerie N., de Vijlder T., Laukens K., Dang T.H., Lemiére F., Mertens I., Valkenburg D., Blust R., Witters E. (2011). Next generation functional proteomics in non-model plants: a survey on techniques and applications for the analysis of protein complexes and post-translational modifications. *Phytochemistry* **72**: 1192-1218.
- Ren Y., Chen L., Zhang Y., Kang X., Zhang Z., Wang Y. (2012). Identification of novel and conserved *Populus tomentosa* microRNA as components of a response to water stress. *Funct. Integr. Genomics* **12**: 327-339.
- Reynolds M., Tuberosa R. (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 171-179.
- Reynolds M.P., Mujeeb-Kazi A., Sawkins M. (2005). Prospects for utilising plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought- and salinity-prone environments. *Ann. Appl. Biol.* **146**: 239-259.
- Reynolds M.P., Saint Pierre C., Vargas M., Saad A.S.I., Condon A.G. (2007). Evaluating potential genetic gains in wheat associated with stress-adaptive trait expression in elite genetic resources under drought and heat stress. *Crop Sci.* **47**: S172-S189.
- Reynolds M.P., Skovmand B., Trethowan R.M., Singh R.P., van Ginkel M. (2000). Applying physiological strategies to wheat breeding. CIMMYT, Mexico, pp 49-56.

- Reynolds M.P., Trethowan R.M. (2007). Physiological interventions in breeding for adaptation to abiotic stress. In: Spieriz J.H.J., Struik P.C., van Laar H.H (eds.): *Scale and Complexity in Plant Systems Research: Gene-Plant-Crop Relations*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, pp. 129-146.
- Ribaut J. M., Bänzinger M., Betrán J., Jiang C., Edmeades G.O., Dreher K., Hoisington D. (2002). Use of molecular markers in plant breeding: drought tolerance improvement in tropical maize. In: Kang M.S. (ed.): *Quantitative Genetics, Genomics, and Plant Breeding*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 85-99.
- Ribaut J.M., Betran J., Monneveux P., Setter T. (2009). Drought Tolerance in Maize. In: Bennetzen J.N., Hake S.C.(eds): *Handbook of Maize*. Springer, New York, pp. 311-344.
- Riccardi F., Gazeau P., Jacquemot M-P., Vincent D., Zivy M. (2004). Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 1003-1011.
- Riccardi F., Gazeau P., de Vienne D., Zivy M. (1998). Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol.* **117**: 1253-1263.
- Ricciardi L., Polignano G.B., de Giovanni C. (2001). Genotypic response of faba bean to water stress. *Euphytica* **118**: 39-46.
- Richardson A.D., Duigan S.P., Berlyn G.P. (2002). An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. *New Phytol.* **153**: 185-194.
- Ristic Z., Cass D.D. (1991a). Chloroplast structure after water shortage and high temperature in two lines of *Zea mays* L. that differ in drought resistance. *Bot. Gaz.* **152**: 186-194.
- Ristic Z., Cass D.D. (1991b). Leaf anatomy of *Zea mays* L. in response to water shortage and high temperature: a comparison of drought-resistance and drought-sensitive. *Bot. Gaz.* **152**: 173-185.
- Ristic Z., Cass D.D. (1992). Chloroplast structure after water and high-temperature stress in two lines of maize that differ in endogenous levels of abscisic acid. *J. Plant Sci.* **153**: 186-196.
- Robbins M.L., Roy A., Wang P.H., Gaffoor I., Sekhon R.S., de O. Buanafina M.M., Rohila J.S., Chopra S. (2013). Comparative proteomics analysis by DIGE and iTRAQ provides insight into the regulation of phenylpropanoids in maize. *J. Proteomics* **93**: 254-275.
- Robinson S.P., Portis A.R., Jr. (1989). Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase protein prevents the *in vitro* decline in activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Physiol.* **90**: 968-971.
- Rodziewicz P., Swarczewicz B., Chmielewska K., Wojakowska A., Stobiecki M. (2014). Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes. *Acta Physiol. Plant.* **36**: 1-19.
- Roháček K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* **40**: 13-29.
- Rollins J.A, Habte E., Templer S.E., Colby T., Schmidt J., von Korff M. (2013). Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* **64**: 3201-3212.
- Roostaei M., Mohammadi S.A., Amri A., Majidi E., Nachit M., Haghighparast R. (2011). Chlorophyll fluorescence parameters and drought tolerance in a mapping population of winter bread wheat in the highlands of Iran. *Russ. J. Plant Physiol.* **58**: 351-358.
- Rosielle AA., Hamblin J. (1981). Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environment. *Crop Sci.* **21**: 943-946.
- Rouhi V., Samson R., Lemeur R., van Damme P. (2007). Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. *Environ. Exp. Bot.* **59**: 117-129.
- Rouse J.W., Haas R.H., Scell J.A., Deering D.W., Harlan J.C. (1974). Monitoring the vernal advancement of retrogradation of natural vegetation. NASA/GSFC Type III, 371.
- Roy H., Andrews T.J. (2000). Rubisco: assembly and mechanism. In: Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. (eds.): *Photosynthesis: Physiology and Metabolism (Advances in Photosynthesis, Vol. 9)*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 53-83.
- Royo C., García del Moral L.F., Aparicio N., Villegas D., Casadesús J., Araus J.L. (2000). Tools for improving the efficiency of durum wheat selection under Mediterranean conditions. In: Royo C., Nachit M., Di Fonzo N., Araus J.L. (eds.): *Durum Wheat Improvements in the Mediterranean Region: New Challenges*. Zaragoza: CIHEAM (Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 40), Zaragoza, pp. 63-70.
- Ruban A.V., Murchie E.H. (2012). Assessing the photoprotective effectiveness of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching: A new approach. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1817**: 977-982.
- Sade N., Gebremedhin A., Moshelion M. (2012). Risk-taking plants. Anisohydric behavior as a stress-resistance trait. *Plant Signal. Behav.* **7**: 767-770.
- Saint Pierre C., Crossa J.L., Bonnett D., Yamaguchi-Shinozaki K., Reynolds P.M. (2012). Phenotyping transgenic wheat for drought resistance. *J. Exp. Bot.* **63**: 1799-1808.
- Sairam R.K., Deshmukh P.S., Saxena D.C. (1998). Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. *Biol. Plant.* **41**: 387-394.
- Sairam R.K., Deshmukh P.S., Shukla D.S. (1997a). Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *J. Agron. Crop Sci* **178**: 171-178.
- Sairam R.K., Saxena D.C. (2000). Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *J. Agron. Crop Sci.* **184**: 55-61.
- Sairam R.K., Shukla D.S., Saxena D.C. (1997b). Stress induced injury and antioxidant enzymes in relation to drought tolerance in wheat genotypes. *Biol. Plant.* **40**: 357-364.
- Salekdeh G.H., Komatsu S. (2007). Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow. *Proteomics* **7**: 2976-2996.
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B., Bennett J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics* **2**: 1131-1145.
- Sanda S., Yoshida K., Kuwano M., Kawamura T., Munekage Y.N., Akashi K., Yokota A. (2011). Responses of the photosynthetic electron transport system to excess light energy caused by water deficit in wild watermelon. *Physiol. Plant.* **142**: 247-264.

- Sato Y., Yokoya S. (2008). Enhanced tolerance to drought in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* **27**: 329-334.
- Sayar R., Khemira H., Kameli A., Mosbahi M. (2008). Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Agron. Res.* **6**: 79-90.
- Scippa G.S., Di Michele M., Onelli E., Patrignani G., Chiatante D., Bray E.A. (2004). The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. *J. Exp. Bot.* **55**: 99-109.
- Seelig H.D., Adams W.W., III, Hoehn A., Stodieck L.S., Klaus D.M., Emery W.J. (2008a). Extraneous variables and their influence on reflectance-based measurements of leaf water content. *Irrig. Sci.* **26**: 407-414.
- Seelig H.D., Hoehn A., Stodieck L.S., Klaus D.M., Adams W.W., III, Emery W.J. (2008b). The assessment of leaf water content using leaf reflectance ratios in the visible, near-, and short-wave-infrared. *Int. J. Remote Sens.* **29**: 3701-3713.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J.* **31**: 279-292.
- Seki M., Umezawa T., Urano K., Shinozaki K. (2007). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 296-302.
- Selmani A., Wassom C.E. (1993). Daytime chlorophyll fluorescence measurement in field-grown maize and its genetic variability under well-watered and water-stressed conditions. *Field Crop. Res.* **31**: 173-184.
- Semagn K., Bjørnstad Å., Xu Y. (2010). The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electron. J. Biotechnol.* **13**: 16-17.
- Sengupta D., Kannan M., Reddy A.R. (2011). A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Planta* **233**: 111-1127.
- Sergeant K., Spiess N., Renaut J., Wilhelm E., Hausman J.F. (2011). One dry summer: a leaf proteome study on the response of oak to drought exposure. *J. Proteomics* **74**: 1385-1395.
- Serraj R., Sinclair T.R. (2002). Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environ.* **25**: 333-341.
- Setter T.L. (2012). Analysis of constituents for phenotyping drought tolerance in crop improvement. *Front. Physiol.* **3**: 190.
- Shamim F., Johnson G.N., Naqvi S.M.S., Waheed A. (2013). Higher antioxidant capacity protects photosynthetic activities as revealed by Chl *a* fluorescence in drought tolerant tomato genotypes. *Pak. J. Bot.* **45**: 1631-1642.
- Shanker A.K., Maheswari M., Yadav S.K., Desai S., Bhanu D., Attal N.B., Venkateswarlu B. (2014). Drought stress responses in crops. *Funct. Integr. Genomics* **14**: 11-22.
- Shao H.B., Chu L.Y., Jaleel C.A., Manivannan P., Panneerselvam R., Shao M.A. (2009). Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants – biotechnologically and sustainably improving agriculture and the environment in arid regions of the globe. *Crit. Rev. Biotechnol.* **29**: 131-151.
- Shao H.B., Jiang S.Y., Li F.M., Chu L.Y., Zhao C.X., Shao M.A., Zhao X.N., Li F. (2007). Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **54**: 33-36.
- Shao H.B., Liang Z.S., Shao M.A., Wang B.C. (2005). Changes of anti-oxidative enzymes and membrane peroxidation for soil water deficits among 10 wheat genotypes at seedling stage. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **42**: 107-113.
- Sharp R.E. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell Environ.* **25**: 211-222.
- Shen H., He H., Li J., Chen W., Wang X., Guo L., Peng Z., He G., Zhong S., Qi Y., Terzaghi W., Deng X.W. (2012). Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids. *Plant Cell* **24**: 875-892.
- Sheshshayee M.S., Bindumadhava H., Ramesh R., Prasad T.G., Lakshminarayana M.R., Udayakumar M. (2005). Oxygen isotope enrichment ($\Delta^{18}\text{O}$) as a measure of time-averaged transpiration rate. *J. Exp. Bot.* **56**: 3033-3039.
- Shi H., Ye T., Chan Z. (2013). Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous polyamines in the bermudagrass (*Cynodon dactylon*) response to salt and drought stresses. *J. Proteome Res.* **12**: 4951-4964.
- Shi L.X., Schröder W. P. (2004). The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1608**: 75-96.
- Shikanai T. (2007). Cyclic electron transport around Photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 199-217.
- Shinopoulos K.E., Brudvig G.W. (2012). Cytochrome *b*₅₅₉ and cyclic electron transfer within photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1817**: 66-75.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* **58**: 221-227.
- Shu L., Lou Q., Ma C., Ding W., Zhou J., Wu J., Feng F., Lu X., Luo L., Xu G., Mei H. (2011). Genetic, proteomic and metabolic analysis of the regulation of energy storage in rice seedlings in response to drought. *Proteomics* **11**: 4122-4138.
- Shu L.B., Ding W., Wu J.H., Feng F.J., Luo L.J., Mei H.W. (2010). Proteomic analysis of rice leaves shows the different regulations to osmotic stress and stress signals. *J. Integr. Plant Biol.* **52**: 981-995.
- Shugaeva N.A., Vyskrebentseva E.I., Orekhova S.O., Shugaev A.G. (2007). Effect of water deficit on respiration of conducting bundles in leaf petioles of sugar beet. *Russ. J. Plant Physiol.* **54**: 329-335.
- Schafleitner R., Gutierrez R., Espino R., Gaudin A., Pérez J., Martínez M., Domínguez A., Tincopa L., Alvarado C., Numberto G., Bonierbale M. (2007). Field screening for variation of drought tolerance in *Solanum tuberosum* L. by agronomical, physiological and genetic analysis. *Potato Res.* **50**: 71-85.
- Schansker G., Tóth S.Z., Holzwarth A.R., Garab G. (2013). Chlorophyll *a* fluorescence: beyond the limits of the Q_A model. *Photosynth. Res.* **120**: 43-58.
- Schapendonk A.H.C.M., Spitters C.J.T., Groot P.J. (1989). Effect of water stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence of five potato cultivars. *Potato Res.* **32**: 17-32.
- Scharf K.D., Berberich T., Ebersberger I., Nover L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochim. Biophys. Acta – Gene Regul. Mech.* **2**: 104-119.

- Schnable P.S., Springer N.M. (2013). Progress toward understanding heterosis in crop plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 71-88.
- Schoefs B. (2004). Determination of pigments in vegetables. *J. Chromatogr. A* **1054**: 214-226.
- Schöttler M.A., Albus C.A., Bock R. (2011). Photosystem I: its biogenesis and function in higher plants. *J. Plant Physiol.* **168**: 1452-1461.
- Schulze W.X., Usadel B. (2010). Quantitation in mass-spectrometry-based proteomics. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 491-516.
- Schuppler U., He P.H., John P.C.L., Munns R. (1998). Effect of water stress on cell division and Cdc2-like cell cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiol.* **117**: 667-678.
- Silva P.E.M., Cavatte P.C., Morais L.E., Medina E.F., DaMatta F.M. (2013). The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: implications for breeding aimed at improving drought tolerance. *Environ. Exp. Bot.* **87**: 49-57.
- Simova-Stoilova L., Demirevska K., Petrova T., Tsenov N., Feller U. (2009). Antioxidative protection and proteolytic activity in tolerant and sensitive wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties subjected to long-term field drought. *Plant Growth Regul.* **58**: 107-117.
- Sims D.A., Gamon J.A. (2002). Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sens. Environ.* **81**: 337-354.
- Singh P., Kanemasu E.T. (1983). Leaf and canopy temperatures of pearl millet genotypes under irrigated and nonirrigated conditions. *Agron. J.* **75**: 497-501.
- Singh S., Gupta A.K., Kaur N. (2012). Differential responses of antioxidative defence system to long-term field drought in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes differing in drought tolerance. *J. Agron. Crop Sci.* **198**: 185-195.
- Sivaramakrishnan S., Patell V.Z., Flower D.J., Peacock J.M. (1988). Proline accumulation and nitrate-reductase activity in contrasting sorghum lines during mid-season drought stress. *Physiol. Plant.* **74**: 418-426.
- Skirycz A., Memmi S., De Bodt S., Maleux K., Obata T., Fernie A.R., Devreese B., Inzé D. (2011). A reciprocal 15N-labeling proteomic analysis of expanding *Arabidopsis* leaves subjected to osmotic stress indicates importance of mitochondria in preserving plastid functions. *J. Proteome Res.* **10**: 1018-1029.
- Smirnov N. (1993). The role of active oxygen in response of plants to water deficit and dessication. *New Phytol* **125**: 27-58.
- Sokol A., Kwiatkowska A., Jerzmanowski A., Prymakowska-Bosak M. (2007). Up-regulation of stress-inducible genes in tobacco and *Arabidopsis* cells in response to abiotic stresses and ABA treatment correlates with dynamic changes in histone H3 and H4 modifications. *Planta* **227**: 245-254.
- Son D., Sugiyama T. (1992). Molecular cloning of an alanine aminotransferase from NAD-malic enzyme type C4 plant *Panicum miliaceum*. *Plant Mol. Biol.* **20**: 705-713.
- Song S., Li L., Yang X., Fu X., Xu M., Rocha P., Xia X. (2012). Expression analysis of abiotic stress-responsive genes in two rice heterotic crosses under cold, heat and drought stresses. *Plant Breed.* **131**: 267-275.
- Songsri P., Jogloy S., Holbrook C.C., Kesmala T., Vorasoot N., Akkasaeng C., Patanothai A. (2009). Association of root, specific leaf area and SPAD chlorophyll meter reading to water use efficiency of peanut under different available soil water. *Agric. Water Manage.* **96**: 790-798.
- Songsri P., Jogloy S., Kesmala T., Vorasoot N., Akkasaeng C., Patanothai A., Holbrook C.C. (2008). Heritability of drought resistance traits and correlation of drought resistance and agronomic traits in peanut. *Crop Sci.* **48**: 2245-2253.
- Sonoike K. (1995). Selective photoinhibition of photosystem I in isolated thylakoid membranes from cucumber and spinach. *Plant Cell Physiol.* **36**: 825-830.
- Sreenivasulu N., Harshavardhan V.T., Govind G., Seiler C., Kohli A. (2012). Contrapuntal role of ABA: Does it mediate stress tolerance or plant growth retardation under long-term drought stress? *Gene* **506**: 266-273.
- Sridha S., Wu K. (2006). Identification of *AtHD2C* as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **46**: 124-133.
- Stark J.C., Pavek J.J., McCann I.R. (1991). Using canopy temperature measurements to evaluate drought tolerance of potato genotypes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **116**: 412-415.
- Stirbet A. (2013). Excitonic connectivity between photosystem II units: what is it, and how to measure it? *Photosynth. Res.* **116**: 189-214.
- Stirbet A., Govindjee (2012). Chlorophyll *a* fluorescence induction: a personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth. Res.* **113**: 15-61.
- Stirbet A.D., Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and application of the OJIP fluorescence transient. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **104**: 236-257.
- Strasser B.J., Stirbet A.D. (1998). Heterogeneity of photosystem II probed by the numerically simulated chlorophyll *a* fluorescence rise. *Math. Comput. Simul.* **48**: 3-9.
- Strasser B.J., Strasser R.J. (1995). Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: Mathis P. (ed.). *Photosynthesis: From Light to Biosphere* (Vol. 5), Kluwer Academics, London, pp. 977-980.
- Strasser R.J., Srivastava A., Tsimilli-Michael M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Mohanty P., Yunus U., Pathre M. (eds.): *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. Taylor and Francis, London, pp. 445-483.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004). Analysis of the chlorophyll *a* fluorescence transient. In: Papageorgiou G.C., Govindjee (eds.): *Chlorophyll *a* Fluorescence. A Signature of Photosynthesis* (Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 19). Springer, Dordrecht, pp 321-362.
- Subrahmanyam D., Subash N., Haris A., Sikka A.K. (2006). Influence of water stress on leaf photosynthetic characteristics in wheat cultivars differing in their susceptibility to drought. *Photosynthetica* **44**: 125-129.
- Sunkar R., Li Y.F., Jagadeeswaran G. (2012). Functions of microRNAs in plant stress responses. *Trends Plant Sci.* **17**: 196-203.
- Suorsa M., Sirpiö S., Allahverdiyeva Y., Paakkari V., Mamedov F., Styring S., Aro E.M. (2006). PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant Photosystem II. *J. Biol. Chem.* **281**: 145-150.

- Synková H., Wilhelmová N., Holá D., Haisel D., Šesták Z. (1997). Comparison of chlorophyll fluorescence kinetics and photochemical activities of isolated chloroplasts in genetic analysis of *Lycopersicon esculentum* Mill. hybrids. *Photosynthetica* **34**: 427-438.
- Szabados L., Savouré A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* **15**: 89-97.
- Šesták Z., Čatský J. (1966). Metody studia fotosyntetické produkce rostlin. Academia, Praha.
- Tai F.J., Yuan Z.L., Wu X.L., Zhao P.F., Hu X.L., Wang W. (2011). Identification of membrane proteins in maize leaves, altered in expression under drought stress through polyethylene glycol treatment. *Plant Omics J.* **4**: 250-256.
- Takahashi S., Murata N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends Plant Sci.* **13**: 178-182.
- Talebi R. (2011). Evaluation of chlorophyll content and canopy temperature as indicators for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **5**: 1457-1462.
- Tardieu F. (2012). Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario. *J. Exp. Bot.* **63**: 25-31.
- Taylor N.L., Tan Y.F., Jacoby R.P., Millar A.H. (2009). Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *J. Proteomics* **72**: 367-378.
- Terashima I., Funayama S., Sonoike K. (1994). The site of photoinhibition in leaves of *Cucumis sativus* L. at low temperatures is photosystem I, not photosystem II. *Planta* **193**: 300-306.
- Tezara W., Mitchell V.J., Driscoll S.D., Lawlor D.W. (1999). Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *Nature* **401**: 914-917.
- Thelen J.J., Peck S.C. (2007). Quantitative proteomics in plants: choices in abundance. *Plant Cell* **19**: 3339-3346.
- Thomas H., Howarth C.J. (2000). Five ways to stay green. *J. Exp. Bot.* **51** (Suppl. 1): 329-337.
- Thomas H., Ougham H. (2014). The stay-green trait. *J. Exp. Bot.* doi: 10.1093/jxb/eru037
- Timperio A.M., Egidi M.G., Zolla L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics* **71**: 391-411.
- Torres G.A.M., Gimenes G.A., de Rosa V.E., Jr., Quecini V. (2007). Identifying water stress-response mechanisms in citrus by *in silico* transcriptome analysis. *Genet. Mol. Biol.* **30**: 888-905.
- Trachsel H., Staehelin T. (1979). Initiation of mammalian protein synthesis. The multiple functions of the initiation factor eIF-3. *Biochim. Biophys. Acta – Nucl. Acid. Protein Synth.* **565**: 305-314.
- Trethowan R.M., Reynolds M. (2007). Drought resistance: genetic approaches for improving productivity under stress. In: Buck, H.T., Nisi J.E., Salomón H. (eds.): Wheat Production in Stressed Environments. Springer, Dordrecht-Heidelberg-New York-London, pp. 289-299.
- Tripp J., Mishra S.K., Scharf K.D. (2009). Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts. *Plant Cell Environ.* **32**: 123-133.
- Trivedi I., Ranjan A., Sharma Y.K., Sawant S. (2012). The histone H1 variant accumulates in response to water stress in the drought tolerant genotype of *Gossypium herbaceum* L. *Protein J.* **31**: 477-486.
- Tuberosa R. (2012). Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front. Physiol.* **3**: 347.
- Tuberosa R., Salvi S. (2006). Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci.* **11**: 405-412.
- Tuberosa R., Salvi S., Giuliani S., Sanguineti M.C., Bellotti M., Conti S., Landi P. (2007). Genome-wide approaches to investigate and improve maize response to drought. *Crop Sci.* **47** (S3): S120-S141.
- Tuberosa R., Salvi S., Sanguineti M.C., Landi P., Maccaferri M., Conti S. (2002). Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield: case studies, shortcomings and perspectives in drought-stressed maize. *Ann. Bot.* **89**: 941-963.
- Türkan I., Bor M., Özdemir F., Koca H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Sci.* **168**: 223-231.
- Ulemale C.S., Mate S.N., Deshmukh D.V. (2013). Physiological indices for drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *World J. Agric. Sci.* **9**: 123-131.
- Ullah I., ur-Rahman M., Ashraf M., Zafar Y. (2008). Genotypic variation for drought tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): Leaf gas exchange and productivity. *Flora* **203**: 105-115.
- Umezawa T., Fujita M., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**: 113-122.
- Upreti K.K., Murti G.S.R., Bhatt R.M. (2000). Response of pea cultivars to water stress: changes in morpho-physiological characters, endogenous hormones and yield. *Veg. Sci.* **27**: 57-61.
- Utsumi Y., Tanaka M., Morosawa T., Kurotani A., Yoshida T., Mochida K., Matsui A., Umemura Y., Ishitani M., Shinozaki K., Sakurai T., Seki M. (2012). Transcriptome analysis using a high-density oligomicroarray under drought stress in various genotypes of cassava: an important tropical crop. *DNA Res.* **19**: 335-345.
- Valdes A.E., Irar S., Majada J.P., Rodríguez A., Fernández B., Pagès M. (2013). Drought tolerance acquisition in *Eucalyptus globulus* (Labill.): A research on plant morphology, physiology and proteomics. *J. Proteomics* **79**: 263-276.
- Valero-Galván J., González-Fernández R., Navarro-Cerillo R.M., Gil-Pelegrín E., Jorrín-Novo J.F. (2013). Physiological and proteomic analyses of drought stress response in Holm oak provenances. *J. Proteome Res.* **12**: 5110-5123.
- Valliyodan B., Nguyen H.T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 189-195.
- Van Dijk K., Ding Y., Malkaram S., Riethoven J.J., Liu R., Yang J., Laczko P., Chen H., Xia Y., Ladunga I., Avramova Z., Fromm M. (2010). Dynamic changes in genome-wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **10**: 238.
- Vanderschuren H., Lentz E., Zainuddin I., Gruissem W. (2013). Proteomics of model and crop plant species: status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *J. Proteomics* **93**: 5-19.
- Vanhove A.C., Vermaelen W., Panis B., Swennen R., Carpentier S.C. (2012). Screening the banana biodiversity for drought tolerance: can an *in vitro* growth model and proteomics be used as a tool to discover tolerant varieties and understand homeostasis. *Front. Plant Sci.* **3**: 176.

- Varshney R.K., Bansal K.C., Aggarwal P.K., Datta K.D., Craufurd P.Q. (2011). Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: hope or hype? *Trends Plant Sci.* **16**: 363-371.
- Varshney R.K., Ribaut J.M., Buckler E.S., Tuberosa R., Rafalski J.A., Langridge P. (2012). Can genomics boost productivity of orphan crops? *Nature Biotechnol.* **30**: 1172-1176.
- Vaseva I., Sabotić J., Šustar-Vozlič J., Meglič V., Kidrič M., Demirevska K., Simova-Stoilova L. (2012). The response of plants to drought stress: the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function. In: Neves D.F., Sanz J.D. (eds.): *Droughts: New Research*. Nova Science Publishers, New York, pp. 1-45.
- Veeranagamallaiah G., Prasanthi G., Reddy K.E., Pandurangaiah M., Babu O.S., Sudhakar C. (2011). Group 1 and 2 LEA protein expression correlates with a decrease in water stress induced protein aggregation in horsegram during germination and seedling growth. *J. Plant Physiol.* **168**: 671-677.
- Vendruscolo E.C.G., Schuster I., Pileggi M., Scapim C.A., Molinari H.B.C., Marur C.J., Vieira L.G.E. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant Physiol.* **164**: 1367-1376.
- Vincent D., Ergul A., Bohlman M.C., Tattersall E.A.R., Tillett R.L., Wheatley M.D., Woolsey R., Quilici D.R., Joets J., Schlauch K., Schooley D.A., Cushman J.C., Cramer G.R. (2007). Proteomic analysis reveals differences between *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and cv. Cabernet Sauvignon and their responses to water deficit and salinity. *J. Exp. Bot.* **58**: 1873-1892.
- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M. (2005). Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiol.* **137**: 949-960.
- Vincent D., Zivy M. (2007). Plant proteome responses to abiotic stress. In: Šamaj J., Thelen J.J. (eds.): *Plant Proteomics*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 346-364.
- Von Caemmerer S., Quick W.P. (2000). Rubisco: physiology *in vivo*. In: Leegood R.C., Sharkey T.D., von Caemmerer S. (eds.): *Photosynthesis: Physiology and Metabolism* (Advances in Photosynthesis, Vol. 9). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp. 85-113.
- Wagner A.M., Moore A.L. (1997). Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci. Rep.* **17**: 319-333.
- Wang D., Li X.F., Zhou Z.J., Feng X.P., Yang W.J., Jiang D.A. (2010a). Two Rubisco activase isoforms may play different roles in photosynthetic heat acclimation in the rice plant. *Physiol. Plant.* **139**: 55-67.
- Wang W.S., Pan Y.J., Zhao X.Q., Dwivedi D., Zhu L.H., Ali J., Li Z.K. (2011). Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* **62**: 1951-1960.
- Wang X., Chen S., Zhang H., Shi L., Cao F., Guo L., Xie Y., Wang T., Yan X., Dai S. (2010b). Desiccation tolerance mechanism in resurrection fern-ally *Selaginella tamariscina* revealed by physiological and proteomic analysis. *J. Proteome Res.* **9**: 6561-6577.
- Wang Z.Y., Portis A.R. (1992). Dissociation of ribulose-1,5-bisphosphate bound to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its enhancement by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase-mediated hydrolysis of ATP. *Plant Physiol.* **99**: 1348-1353.
- Wasson A.P., Richards R.A., Chatrath R., Misra S.C., Sai Prasad S.V., Rebetzke G.J., Kirkegaard J.A., Christopher J. Watt M. (2012). Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. *J. Exp. Bot.* **63**: 3485-3498.
- Wellburn A.R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **144**: 207-313.
- Wendelboe-Nelson C., Morris P.C. (2012). Proteins linked to drought tolerance revealed by DIGE analysis of drought resistant and susceptible barley varieties. *Proteomics* **12**: 3374-3385.
- White J.W., Andrade-Sanchez P., Gore M.A., Bronson K.F., Coffelt T.A., Conley M.M., Feldmann K.A., French A.N., Heun J.T., Hunsaker D.J., Jenks M.A., Kimball B.A., Roth R.L., Strand R.J., Thorp K.R., Wall G.W., Wang G. (2012). Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crop. Res.* **133**: 101-112.
- Whitmore J.S. (2000). *Drought Management on Farmland*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Winterhalter L., Mistele B., Jampatong S., Schmidhalter U. (2011). High throughput phenotyping of canopy water mass and canopy temperature in well-watered and drought stressed tropical maize hybrids in the vegetative stage. *Eur. J. Agron.* **35**: 22-32.
- Wise R.R. (1995). Chilling-enhanced photooxidation: the production, action and study of reactive oxygen species produced during chilling in the light. *Photosynth Res.* **45**: 79-97.
- Witt S., Galicia L., Lisek J., Cairns J., Tiessen A., Araus J.L., Palacios-Rojas N., Fernie A.R. (2012). Metabolic and phenotypic responses of greenhouse-grown maize hybrids to experimentally controlled drought stress. *Mol. Plant* **5**: 401-417.
- Wolf J. (1996). User's Manual for the Software Package CBE, Version 4.0. (A universal program for estimating crossbreeding effects). VÚŽV Praha-Uhřetěves, Praha.
- Woo N.S., Badger M.R., Pogson B.J. (2008). A rapid, non-invasive procedure for quantitative assessment of drought survival using chlorophyll fluorescence. *Plant Methods* **4**: 27.
- Wood A.J., Goldsbrough P.B. (1997). Characterization and expression of dehydrins in water-stressed *Sorghum bicolor*. *Physiol. Plant.* **99**: 144-152.
- Wu Q., Li C., Ke L., Jiao C., Jiang J., Sun X., Li F., Wang C. (2011). A high-efficiency, two-dimensional gel electrophoresis platform for mature leaves of grass pea (*Lathyrus sativus* L.). *Acta Physiol. Plant.* **33**: 2387-2397.
- Wu R., Garg A. (2003). Engineering rice plants with trehalose-producing genes improves tolerance to drought, salt and low temperature. ISB News Report (2003).
- Wu W.W., Wang G., Baek S.J., Shen R.F. (2006). Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J. Proteome Res.* **5**: 651-658.
- Xiao X., Yang F., Zhang S., Korpelainen H., Li C. (2009). Physiological and proteomic responses of two contrasting *Populus cathayana* populations to drought stress. *Physiol. Plant.* **136**: 150-168.

- Xiong J.H., Fu B.J., Xu H.X., Li Y.S. (2010). Proteomic analysis of PEG-simulated drought stress responsive proteins of rice leaves using a pyramiding rice line at the seedling stage. *Bot. Stud.* **51**: 137-145.
- Xu C., Huang B. (2010a). Comparative analysis of drought responsive proteins in Kentucky bluegrass cultivars contrasting in drought tolerance. *Crop Sci.* **50**: 2543-2552.
- Xu C., Huang B. (2010b). Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. *J. Plant Physiol.* **167**: 1477-1485.
- Xu G., Li C., Yao Y., (2009). Proteomics analysis of drought stress-responsive proteins in *Hippophae rhamnoides* L. *Plant Mol. Biol. Rep.* **27**: 153-161.
- Xu W., Subudhi P.K., Crasta O.R., Rosenow D.T., Mullet J.E., Nguyen H.T. (2000). Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Genome* **43**: 461-469.
- Xu Y., Crouch J.H. (2008). Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice. *Crop Sci.* **48**: 391-407.
- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2005). Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* **10**: 88-94.
- Yang F., Wang Y., Miao L.F. (2010a). Comparative physiological and proteomic responses to drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Physiol. Plant.* **139**: 388-400.
- Yang S., Vanderbeld B., Wan J., Huang Y. (2010b). Narrowing down the targets: towards successful engineering of drought-tolerant crops. *Mol. Plant* **3**: 469-490.
- Ye J., Wang S., Zhang F., Xie D., Yao Y. (2013). Proteomic analysis of leaves of different wheat genotypes subjected to PEG 6000 stress and rewatering. *Plant Omics J.* **6**: 286-294.
- Yee D., Goring D.R. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J. Exp. Bot.* **60**: 1109-1121.
- Yordanov I., Velikova V., Tsonov T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol. Sp. Iss.* **187**-206.
- Yoshida T., Fujita Y., Sayama H., Kidokoro S., Maruyama K., Mizoi J., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2010). AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *Plant J.* **61**: 672-685.
- Yusuf M.A., Kumar D., Rajwanshi R., Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Govindjee, Sarin N.B. (2010). Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1797**: 1428-1438.
- Zadražnik T., Hollung K., Egge-Jacobsen W., Meglič V., Šuštar Vozlič J. (2013). Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Proteomics* **78**: 254-272.
- Zeng B., Xu X., Zhou S., Zhu C., Tang C. (2011). Effects of temperature and light on photosynthetic heterosis of an upland cotton hybrid cultivar. *Crop Sci.* **52**: 282-291.
- Zhang C.J., Chu H.J., Chen G.X., Shi D.W., Zuo M., Wang J., Lu C.G., Wang P., Chen L. (2007). Photosynthetic and biochemical activities in flag leaves of a newly developed superhigh-yield hybrid rice (*Oryza sativa*) and its parents during the reproductive stage. *J. Plant Res.* **120**: 209-217.
- Zhang H.M., Zhang L.S., Liu L., Zhu W.N., Yang B. (2013). Changes of dehydrin profiles induced by drought in winter wheat at different developmental stages. *Biol. Plant.* **57**: 797-800.
- Zhang M., Li G., Huang W., Bi T., Chen G., Tang Z., Su W., Sun W. (2010a). Proteomic study of *Carissa spinarum* in response to combined heat and drought stress. *Proteomics* **10**: 3117-3129.
- Zhang S., Chen F., Peng S., Ma W., Korpelainen H., Li C. (2010b). Comparative physiological, ultrastructural and proteomic analyses reveal sexual differences in the responses of *Populus cathayana* under drought stress. *Proteomics* **10**: 2661-2677.
- Zhao Y., Du H., Wang Z., Huang B. (2011). Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C₄ perennial grass species, *Cynodon dactylon* × *Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*. *Physiol. Plant.* **141**: 40-55.
- Zhao Z., Zhang W., Stanley B.A., Assmann S.M. (2008). Functional proteomics of *Arabidopsis thaliana* guard cells uncovers new stomatal signaling pathways. *Plant Cell* **20**: 3210-3226.
- Zheng J., Fu J., Gou M., Huai J., Jian M., Huang Q., Guo X., Dong Z., Wang H., Wang G. (2010). Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Mol. Biol.* **72**: 407-412.
- Zheng J., Zhao J., Tao Y., Wang J., Liu Y., Fu J., Jin Y., Gao P., Zhang J., Bai Y., Wang G. (2004). Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA microarray. *Plant Mol Biol* **55**: 807-823.
- Zhou G., Yang L.T., Li Y.R., Zou C.L., Huang L.P., Qiu L.H., Huang X., Srivastava M.K. (2012). Proteomic analysis of osmotic stress-responsive proteins in sugarcane leaves. *Plant Mol. Biol. Rep.* **30**: 349-359.
- Zhou Y., Cai H., Xiao J., Li X., Zhang Q., Lian X. (2009). Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds. *Theor. Appl. Genet.* **118**: 1381-1390.
- Zhou Y., Lam H.M., Zhang J. (2007). Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. *J. Exp. Bot.* **58**: 1207-1217.
- Zhu J., Ingram P.A., Benfey P.N., Elich T. (2011). From lab to field, new approaches to phenotyping root system architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 310-317.
- Zhu W., Liu K., Wang X.D. (2008). Heterosis in yield, fiber quality, and photosynthesis of okra leaf oriented hybrid cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Euphytica* **164**: 283-291.
- Zia S., Romano G., Spreer W., Sanchez C., Cairns J., Araus J.L., Müller J. (2013). Infrared thermal imaging as a rapid tool for identifying water-stress tolerant maize genotypes of different phenology. *J. Agron. Crop. Sci.* **199**: 75-84.
- Ždánková H. (2003). Heteróze ve fotosyntetických charakteristikách listů kukuřice (*Zea mays* L.) vystavené vodnímu deficitu. *Diplomová práce*, Přírodovědecká fakulta UK v Praze.
- Živčák M., Brestič M., Olšovská K., Slamka P. (2008). Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environ.* **54**: 133-139.

8. Přílohy

Přílohy práce jsou uvedeny na CD vloženém zevnitř na zadní straně práce.

Příloha 1 – soubor **Priloha1.xls**

Výsledky analýzy vybraných morfologických a fyziologických charakteristik hodnocených v souboru 25 inbredních linií kukuřice pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6, resp. 10 dnů od začátku stresové periody (Experimentální celek 3).

List „Průměry a SD“: Průměry a směrodatné odchylky ($n = 8$) hodnocených charakteristik u rostlin pěstovaných v podmínkách dostatku vody (Kontrola) nebo vystavených vodnímu deficitu (Sucho).

List „Korelace mezi charakteristikami“: Korelace mezi vybranými morfologickými a fyziologickými charakteristikami. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonových korelačních koeficientů (r) společně s označením jejich statistické průkaznosti (hodnoty vyznačené pouze kurzívou ... korelace je průkazná při $p = 0,05$, hodnoty vyznačené současně kurzívou a tučným písmem ... korelace je průkazná při $p = 0,01$, hodnoty vyznačené pouze tučným písmem ... korelace je průkazná při $p \leq 0,001$).

List „Korelace mezi indexy“: Korelace mezi TOL nebo SSI indexy citlivosti/odolnosti k suchu vypočítanými z vybraných morfologických a fyziologických charakteristik. Uvedeny jsou hodnoty Pearsonových korelačních koeficientů (r) společně s označením jejich statistické průkaznosti (hodnoty vyznačené pouze kurzívou ... korelace je průkazná při $p = 0,05$, hodnoty vyznačené současně kurzívou a tučným písmem ... korelace je průkazná při $p = 0,01$, hodnoty vyznačené pouze tučným písmem ... korelace je průkazná při $p \leq 0,001$).

Vysvětlení použitých zkratk: **DMS** ... hmotnost sušiny nadzemní části rostlin, **DMR** ... hmotnost sušiny kořenů rostlin, **DMT** ... hmotnost sušiny celých rostlin, **P_N** ... čistá rychlost fotosyntézy, **E** ... rychlost transpirace, **g_s** ... vodivost průduchů, **WUE** ... „okamžitá“ efektivita využití vody, **WUE_i** ... „vnitřní“ efektivita využití vody, **PRI** ... fotochemický reflektanční index, **NDVI** ... normalizovaný diferenční vegetační index, **Q_Y** ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII u světelně adaptovaných listů. Charakteristiky primárních fotosyntetických procesů získané analýzou OJIP části křivky indukce fluorescence chlorofylu u temnotně adaptovaných listů: **Φ_{P0}** ... maximální kvantový výtěžek fotochemické přeměny energie v PSII, **Φ_{E0}** ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů z Q_A na Q_B, **Φ_{RE0}** ... kvantový výtěžek toku přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI, **Φ_{D0}** ... kvantový výtěžek disipace zachycené energie, **Ψ_{E0}** ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_A na Q_B, **Ψ_{RE0}** ... účinnost/pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen až na koncové akceptory PSI, **δ_{RE0}** ... účinnost /pravděpodobnost, s kterou je elektron zachycený PSII přenesen z Q_B až na koncové akceptory PSI, **γ_{RC}** ... pravděpodobnost, že PSII chlorofyl funguje jako reakční centrum, **ABS/RC** ... průměrný tok zachycených fotonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, **TP₀/RC** ... maximální tok zachycených excitonů vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, **ET₀/RC** ... tok přenosu elektronů z Q_A na Q_B vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, **RE₀/RC** ... tok přenosu elektronů až na koncové akceptory PSI vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, **DI₀/RC** ... tok disipované energie vyjádřený na jedno reakční centrum PSII, **PI_{ABS}** ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci Q_B, **PI_{TOTAL}** ... performanční index zachování energie fotonů zachycených světlosběrnou anténou PSII až po redukci koncových akceptorů PSI.

Příloha 2 – soubor Priloha2.xls

Proteiny/EST identifikované na základě iTRAQ analýzy listového proteomu dvou inbredních linií kukuřice (2023 a CE704) pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 6 dnů od začátku stresové periody (Experimentální celek 4). Názvy proteinů jsou uvedeny v angličtině, vzhledem k tomu, že řada z nich nemá oficiální české ekvivalenty.

Listy „Proteiny NCBI“ a „EST“: Identifikace a kvantifikace všech iTRAQ-značených peptidů charakterizovaných tandemovou MS/MS.

Listy „ET, SM, MT, LM, AM, DX, ST, DH, CP, SG, PT, GE, MS“: Rozřazení identifikovaných proteinů do funkčních kategorií. AM ... proteiny účastníci se metabolismu aminokyselin, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce a syntézy chlorofylu, CP ... chaperony, DH ... dehydriny, DX ... detoxifikační proteiny, GE ... proteiny účastníci se genové exprese a její regulace, LM ... proteiny účastníci se metabolismu lipidů, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastníci se transportu různých látek, PT ... proteázy a jejich inhibitory, SG ... proteiny účastníci se buněčné signalizace, SM ... proteiny účastníci se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂), ST ... stresové proteiny. Uvedeny jsou pouze ty proteiny, u nichž absolutní hodnoty poměrů S_X/C_X (kde S_X představuje stresovanou rostlinu a C_X představuje kontrolní rostlinu genotypu X), případně (pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila) $-1/(S_X/C_X)$, nebo odvozeného poměru $(C_{P2}/S_{P2})/(C_{P1}/S_{P1})$, (případně – pokud šlo o proteiny s nižší hladinou u stresovaných rostlin – poměru $-1/[(C_{P2}/S_{P2})/(C_{P1}/S_{P1})]$), byly větší nebo rovny 2.

Příloha 3 – soubor Priloha3.xls

Proteiny identifikované na základě iTRAQ analýzy listového proteomu inbredních linií kukuřice 2023 (P1) a CE704 (P2) a jejich F1 kříženců 2023×CE704 (F1) a CE704×2023 (F1') pěstovaných v podmínkách dostatku vody nebo vystavených vodnímu deficitu po dobu 10 dnů od začátku stresové periody (Experimentální celek 5). Názvy proteinů jsou uvedeny v angličtině, vzhledem k tomu, že řada z nich nemá oficiální české ekvivalenty.

List „Proteiny NCBI“: Identifikace a kvantifikace všech iTRAQ-značených peptidů charakterizovaných tandemovou MS/MS.

Listy „ET, SM, MT, LM, AM, DX, ST, DH, CP, SG, PT, GE, MS“: Rozřazení identifikovaných proteinů do funkčních kategorií. AM ... proteiny účastníci se metabolismu aminokyselin, ET ... proteiny fotosyntetického elektron-transportního řetězce a syntézy chlorofylu, CP ... chaperony, DH ... dehydriny, DX ... detoxifikační proteiny, GE ... proteiny účastníci se genové exprese a její regulace, LM ... proteiny účastníci se metabolismu lipidů, MS ... různé proteiny, MT ... membránové proteiny účastníci se transportu různých látek, PT ... proteázy a jejich inhibitory, SG ... proteiny účastníci se buněčné signalizace, SM ... proteiny účastníci se metabolismu sacharidů (včetně fotosyntetické fixace CO₂), ST ... stresové proteiny. Uvedeny jsou pouze ty proteiny, u nichž absolutní hodnoty poměrů S_X/C_X (kde S_X představuje stresovanou rostlinu a C_X představuje kontrolní rostlinu genotypu X), případně (pro proteiny, jejichž hladina se ve stresu ve srovnání s kontrolou snížila) $-1/(S_X/C_X)$, nebo poměrů C_{X1}/C_{X2} , resp. S_{X1}/S_{X2} , kde $X1$ a $X2$ jsou srovnávané genotypy (pokud byla vyšší hladina proteinů u druhého genotypu, byly tyto poměry vyjádřeny jako $-1/C_{X1}/C_{X2}$, resp. $-1/S_{X1}/S_{X2}$), byly větší nebo rovny 2.